

桑叶提取物对小鼠抑郁样行为的影响

张森品^{1,2}, 薛 瑞², 王洛萱², 张 扬², 李劲草², 李 硕², 李 迎², 刘卫群³, 徐月灿³, 张有志^{2*}, 胡素敏^{1*}

[摘要] 目的 研究桑叶提取物(EML)的抗抑郁作用及其机制。方法 雄性BALB/c小鼠随机分组,分别接受连续7 d或单次灌胃(ig)给予EML(100、200和400 mg/kg)后,采用开场实验评价EML对小鼠自发活动的影响,采用行为绝望模型(小鼠悬尾实验和强迫游泳实验)评价EML的抗抑郁活性;单次ig给予EML(100、200和400 mg/kg)后,采用小鼠5-羟色氨酸(5-HTP)诱导甩头实验、育亨宾毒性增强实验和利血平拮抗实验评价EML对单胺能神经系统功能的影响,初步探讨EML的抗抑郁机制。结果 在行为绝望模型中,与溶剂对照组相比,EML(100 mg/kg)连续7 d给药可显著缩短小鼠悬尾和强迫游泳的不动时间,不动时间抑制率分别为35.5%、41%($P<0.05$, $P<0.01$),EML(400 mg/kg)单次给药可显著缩短小鼠悬尾和强迫游泳的不动时间,不动时间抑制率分别为29.1%、35.3%($P<0.05$);自发活动实验结果显示,在受试剂量范围连续7 d给予和单次给予EML对小鼠中枢神经系统均无兴奋或抑制作用;在小鼠5-HTP诱导甩头实验中,单次给予EML 100 mg/kg可显著增加小鼠甩头次数($P<0.05$);在育亨宾毒性增强实验中,单次给予EML(100、200和400 mg/kg)对育亨宾所致小鼠死亡率均无显著影响;在利血平拮抗实验中,与模型组相比,单次给予EML 400 mg/kg可拮抗利血平(2.5 mg/kg, ip)引起的小鼠眼睑下垂($P<0.05$),对肛温下降和运动不能无显著影响。结论 EML具有抗抑郁药理活性,其机制可能与增强5-羟色胺能系统的功能有关。

[关键词] 桑叶提取物;抗抑郁;行为绝望模型;药理学模型

[中图分类号] R964

[文献标志码] A

[文章编号] 1674-0440(2020)04-0269-07

DOI: 10.13220/j.cnki.jipr.2020.04.005

Effects of the mulberry leaf extract on depression-like behavior in mice

ZHANG Sen-pin^{1,2}, XUE Rui², WANG Luo-xuan², ZHANG Yang², LI Jin-cao², LI Shuo²,
LI Ying², LIU Wei-qun³, XU Yue-can³, ZHANG You-zhi^{2*}, HU Su-min^{1*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China; 3. Hunan Hill Life Sciences Co., Ltd., Changsha 425000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the antidepressant effect and mechanism of the extract of mulberry leaf (EML). **Methods** Male BALB/c mice were randomly assigned to receive EML (100, 200 and 400 mg/kg) or vehicle for 7 days or single administration by intragastric (ig) route. The effect of EML on spontaneous activity in mice was evaluated using the open field test. The anti-depressant activity of EML was evaluated using the tail suspension test and forced swimming test. After single ig administration of EML (100, 200 and 400 mg/kg), the effects of EML on the function central monoaminergic nervous system were evaluated using the 5-hydroxy-L-tryptophan (5-HTP) induced head-twitch test, yohimbine toxicity potentiation test and reserpine test in mice. **Results** In the behavioral despair model, the continuous administration of EML (100 mg/kg) for 7 days significantly reduced the immobility time in the tail suspension test and forced swimming test. Compared with the vehicle group, the inhibitory rates of immobility time were 35.5% and 41% ($P<0.05$, $P<0.01$) in the tail suspension test and forced swimming test, respectively. The single treatment with EML (400 mg/kg) also significantly reduced the immobility time in the tail suspension and forced swimming test, and the inhibitory rates of immobility time were 29.1% and 35.3%, respectively ($P<0.05$). The results of spontaneous activity test showed that EML had

基金资助: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2018ZX09739-008)

作者简介: 张森品,女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理学、神经精神药理学, E-mail: 18801378797@163.com

作者单位: 1. 100029 北京,北京中医药大学(张森品,胡素敏); 2. 100850 北京,军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所,抗毒药物与毒理学国家重点实验室(张森品,薛 瑞,王洛萱,张 扬,李劲草,李 硕,李 迎,张有志); 3. 425000 长沙,湖南希尔天然药业有限公司(刘卫群,徐月灿)

***通讯作者:** 张有志,男,研究员,博士生导师,研究方向:中药药理学、神经精神药理学, E-mail: bcczyz@163.com; 胡素敏,女,教授,博士生导师,研究方向:中药基础理论与临床应用研究、辐射损伤的中医药防护研究, E-mail: husm@bucm.edu.cn

no excitatory or inhibitory effect on the central nervous system in mice. In the 5-HTP induced head-twitch test in mice, the single treatment with EML(100 mg/kg) significantly increased the number of head-twitches in mice. In the yohimbine toxicity potentiation test, the single treatment with EML(100, 200 and 400 mg/kg) had no significant effect on the mortality rate in yohimbine-treated mice. In the reserpine test, compared with the model group, the single treatment with EML(400 mg/kg) antagonized reserpine induced ptosis ($P<0.05$) and had no significant effect on the decrease in rectal temperature and akinesia. **Conclusion** EML showed antidepressant effect, and the action mechanism was likely related to the enhancement of the function of serotonergic nervous system.

[Key words] extract of mulberry leaf (EML); antidepressant effect; behavioural despair model; pharmacology model

抑郁症属于情感性精神障碍的最主要类型,具有高患病率和高自杀率的特点,对社会造成严重经济负担。2005~2015年,抑郁症患者的总数增加了18.4%。2015年,世界卫生组织将抑郁症列为造成全球非致命健康损失的首要因素。此外,抑郁症是自杀死亡的主要原因^[1],每年因抑郁症自杀死亡人数高达80万。目前现代医学治疗抑郁症大多基于单胺类神经递质及其受体假说、炎症反应假说、下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)功能失调假说、神经营养因子假说以及多因素综合作用假说等^[2]。治疗抑郁症的主要药物有三环类抗抑郁药、单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)抑制剂、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)重摄取抑制剂、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)重摄取抑制剂、5-HT及NE双重重摄取抑制剂、NE及多巴胺(dopamine, DA)双重重摄取抑制剂以及其他新型抗抑郁剂等,这些药物虽可改善抑郁情绪,但存在不同程度的胃肠功能紊乱、睡眠障碍、认知功能障碍、心脏毒性和性功能障碍等不良反应^[3]。中药因具有多途径和多靶点的治疗特点,可通过多环节发挥抗抑郁作用,且安全性较高,近年来在新型抗抑郁药物研发中受到广泛关注。

中医将抑郁症归于郁证范畴,认为郁证主要因七情所伤、情志不遂、肝气郁结或气郁化火、郁火伤肝而为病,故病位主要在肝,疏肝解郁是重要治法之一^[4]。桑叶为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的干燥叶,为常用中药,性味甘苦寒,归肺肝经,具有疏散风热、清肺润燥、平抑肝阳、清肝明目之功效。20世纪启东名老中医杨先生^[5]认为桑叶疏肝解郁、益阴养血、清而不可伐、补而不滋腻、化中有补、补中寓清,其疏肝调经作用胜于柴胡。

中国桑树资源丰富,桑树中黄酮类成分含量较高,含量高达55.38 mg/g^[6]。黄酮类化合物是一种多酚类物质,作为具有多种重要生物活性及药理作用的次生代谢产物,是国内外研究的热点。前期本实验室研究发现多种黄酮类中药成分具有潜在的抗

抑郁效应^[7]。基于此,本研究旨在评价桑叶提取物(extract of mulberry, EML)的抗抑郁作用,并采用药理学模型对其作用机制进行初探。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性BALB/c小鼠, SPF级、体质量18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证:SCXK(京)2016-0006。饲养于军事医学研究院实验动物中心,饲养温度(23±1)℃,相对湿度(50±10)%,每日6:30~18:30日光灯照明,自由摄食饮水,用生长维持颗粒饲料喂养。实验过程遵循本单位实验动物伦理委员会相关规定。

1.2 药物、试剂和主要仪器

EML(批号:T20181025,黄酮含量41.2%),由湖南希尔天然药业有限公司提供;取干燥的桑叶净料,加5~10倍量的水提取2次,每次1 h,合并前2次提取药液,经冷却至40~50℃后上D-101型大孔树脂柱,依次用水、65%乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液,经回收乙醇后减压浓缩得稠膏,将稠膏采取喷雾干燥即得总黄酮部位EML;取芦丁作对照品(分光光度法测定EML中的黄酮含量为41.2%)。盐酸度洛西汀(duloxetine, DLX,批号:1304002),上海万代制药有限公司。5-羟色氨酸(5-hydroxy-L-tryptophan, 5-HTP;批号:H9772)、育亨宾(yohimbine,批号:Y3125)和利血平(reserpine,批号:WXBC7476V),均购于美国Sigma公司。

开场箱:自制,由底面为80 cm×80 cm、高50 cm四壁光滑的不透明塑料板制成,底面被划分成为16个20 cm×20 cm的等边方格;小鼠悬尾实验箱:自制(20 cm×25 cm×30 cm);小鼠强迫游泳缸:2 L大烧杯;TH-212智能数字测温仪,北京海创高科技有限公司。

1.3 EML连续给药7 d抗抑郁效应研究

实验分组:50只BALB/c小鼠按体质量随机分为溶剂对照组(VEH)、阳性药组(DLX, 20 mg/kg)、EML 100、200和400 mg/kg组,每组10只。各组按

10 ml/kg 给药体积灌胃(ig),末次给药 1 h 后分别进行自发活动实验、悬尾实验和强迫游泳实验,其中 DLX 单次给药后进行测试,EML 连续给药 7 d 进行测试。

小鼠自发活动检测:将小鼠置开场箱一角中心方格内,头朝壁放入,观察 5 min 内小鼠的穿格次数和直立次数。每只动物实验结束后用 30%乙醇清洁开场箱以清除对下一只动物的影响。

小鼠悬尾实验:参照 Steru 等^[11]建立的方法,悬尾箱(25 cm×25 cm×35 cm)顶板中心绳连一个小夹子。用胶带粘在小鼠尾部距离尾尖 2 cm 处,用夹子夹住胶带,使小鼠倒悬于黑色悬尾箱中,头部距离箱底 5 cm。观察 6 min,记录后 4 min 内累计不动时间(t)。以小鼠停止挣扎、呈静止的垂直悬吊状态即为“不动”。计算不动时间抑制率作为有效率指标,公式如下:抑制率(%)=($t_{\text{溶剂对照组}}-t_{\text{给药组}}$)/ $t_{\text{溶剂对照组}} \times 100\%$ 。

小鼠强迫游泳实验:参照 Porsolt 等^[12]建立的方法进行强迫游泳实验,将小鼠置高 20 cm,直径 12 cm,水深 10 cm 的圆柱形玻璃游泳缸中,水温(25±1)℃,观察 6 min,记录后 4 min 内累计不动时间(t)。以小鼠在水中停止挣扎呈漂浮状态、仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面判定为“不动”。计算不动时间抑制率作为有效率指标,公式同前。

1.4 EML 单次给药抗抑郁效应研究

50 只 BALB/c 小鼠分组同 1.3。适应性喂养 5 d 后各组按 10 ml/kg 给药体积灌胃给药,各组单次给药 1 h 后分别进行自发活动实验、悬尾实验和强迫游泳实验,方法同 1.3。

1.5 EML 抗抑郁作用机制初步研究

1.5.1 5-HTP 诱导小鼠甩头实验 50 只 BALB/c 小鼠分组同 1.3。单次 ig 给药 1 h 后腹腔注射(ip)给予 5-HTP 120 mg/kg,立即开始观察,记录 20 min 内小鼠甩头次数^[8]。

1.5.2 小鼠育亨宾毒性增强实验 50 只 BALB/c 小鼠分组同 1.3。单次 ig 给药 1 h 后皮下注射(sc)给予育亨宾 30 mg/kg,观察记录 24 h 内各组动物死亡数^[9]。

1.5.3 利血平耗竭实验 60 只 BALB/c 小鼠除增加模型组(10 只)外,其余分组同 1.3。溶剂对照组和模型组小鼠 ig 给予灭菌注射用水,阳性药组、EML 低、中、高剂量组分别 ig 给予 DLX 20 mg/kg、EML100、200 和 400 mg/kg,给药体积 10 ml/kg。给药后 1 h,溶剂对照组 ip 给予生理盐水,其余各组均 ip 给予利血平 2.5 mg/kg,分别记录以下指标:眼睑下

垂评分、肛温变化和运动不能的只数^[10]。

眼睑下垂评分:给予利血平后 1 h,按小鼠眼睑闭合程度打分:完全睁开 0 分,1/4 闭合 1 分,1/2 闭合 2 分,3/4 闭合 3 分,完全闭合 4 分,统计各组平均得分。

肛温变化:分别于各组给药前(T_0)和给予利血平 2 h 后(T_1)用电子温度计检测小鼠肛温,统计 2 次肛温差值(DT), $DT=T_0-T_1$ 。

运动不能测试:给予利血平后 1 h,将小鼠置于直径 7.5 cm 的圆圈中央进行观察,15 s 内不能走出圆圈记为“运动不能”,记录各组运动不能小鼠只数。

1.6 统计学分析

实验结果数据采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析,计数资料(利血平拮抗实验的运动不能动物数和育亨宾毒性实验的死亡率)采用精确 Fisher exact 检验;其余计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析合并 Dunnett' t 检验,以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EML 连续给药 7 d 对小鼠自发活动的影响

与溶剂对照组比较,DLX 20 mg/kg 组及 EML 低、中、高剂量组小鼠爬格次数和直立次数均无显著性差异,提示 EML 在受试剂量下无中枢兴奋或抑制作用(表 1)。

表 1 桑叶提取物(EML)连续给药 7 d 小鼠开场实验中的直立次数和跨格次数

Tab.1 The number of rearings and crossings in the opening field test in mice after continuous administration of extract of mulberry leaf (EML) for 7 days

组别	直立次数	跨格次数
溶剂对照组	21.8±7.8	121.7±32.0
DLX 20 mg/kg	10.5±5.9	143.6±39.4
EML(mg/kg)		
100	21.3±6.4	101.3±16.9
200	24.7±7.5	115.0±23.9
400	22.5±7.1	104.7±15.2

注:DLX:度洛西汀; $\bar{x} \pm s$, $n=10$

DLX:duloxetine; $\bar{x} \pm s$, $n=10$

2.2 EML 连续给药 7 d 对小鼠悬尾不动时间的影响与溶剂对照组比较,DLX 20 mg/kg 与 EML100

和400 mg/kg均可显著缩短小鼠悬尾不动时间,不动时间抑制率分别为90.7%、35.5%、41% ($P<0.01$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.01$,表2),提示EML具有抗抑郁作用。

表2 EML连续给药7 d对小鼠悬尾不动时间的影响

Tab.2 The effect of EML on the immobility time in the tail suspension test in mice after continuous administration of EML for 7 days

组别	累计不动时间(s)
溶剂对照组	105.9±40.0
DLX 20 mg/kg	9.9±16.6**
EML(mg/kg)	
100	68.3±31.7*
200	80.1±34.6
400	62.5±21.7*

注:* $P<0.05$,** $P<0.01$,与溶剂对照组比较; $\bar{x}\pm s$, $n=10$

* $P<0.05$,** $P<0.01$, compared with the vehicle group; $\bar{x}\pm s$, $n=10$

2.3 EML连续给药7 d对小鼠强迫游泳不动时间的影响

与溶剂对照组比较,DLX 20 mg/kg、EML 100 mg/kg均可显著缩短小鼠强迫游泳不动时间,不动时间抑制率分别为83.5%、35.3%,(均为 $P<0.01$,表3),提示EML具有抗抑郁作用。

表3 EML连续给药7 d对小鼠强迫游泳不动时间的影响

Tab.3 The immobility time in the forced swimming test in mice after continuous administration of EML for 7 days

组别	累计不动时间(s)
溶剂对照组	137.8±28.5
DLX 20 mg/kg	22.7±14.4**
EML(mg/kg)	
100	89.1±30.5**
200	117.3±34.1
400	107.1±43.4

注:** $P<0.01$,与溶剂对照组比较; $\bar{x}\pm s$, $n=10$

** $P<0.01$, compared with the vehicle group; $\bar{x}\pm s$, $n=10$

2.4 EML单次给药对小鼠自发活动的影响

与溶剂对照组小鼠比较,DLX20 mg/kg组及EML低、中、高剂量组小鼠爬格次数和直立次数均无显著性差异,提示EML在受试剂量下无中枢兴奋或抑制作用(表4)。

表4 EML单次给药对开场实验中小鼠的直立次数和跨格次数的影响

Tab.4 The number of rearings and crossings in the opening field test in mice after single administration of EML

组别	直立次数	跨格次数
溶剂对照组	16.10±8.2	101.1±22.1
DLX 20 mg/kg	2.50±2.7	69.50±55.5
EML(mg/kg)		
100	10.20±11.3	86.80±31.4
200	13.90±8.7	94.80±30.6
400	19.40±5.5	116.3±17.6

注: $\bar{x}\pm s$, $n=10$

$\bar{x}\pm s$, $n=10$

2.5 EML单次给药对小鼠悬尾不动时间的影响

与溶剂对照组比较,DLX 20 mg/kg与EML 400 mg/kg可显著缩短小鼠悬尾不动时间,不动时间抑制率分别为78.4%、29.1% ($P<0.01$ 、 $P<0.05$,表5),提示EML具有抗抑郁作用。

表5 EML单次给药对悬尾实验小鼠不动时间的影响

Tab.5 The immobility time on tail suspension test in mice after single administration of EML

组别	累计不动时间(s)
溶剂对照组	110.0±25.9
DLX 20 mg/kg	23.7±17.8**
EML(mg/kg)	
100	93±38.9
200	83.8±23.1
400	78±36.7

注:* $P<0.05$,** $P<0.01$,与溶剂对照组比较; $\bar{x}\pm s$, $n=10$

* $P<0.05$,** $P<0.01$, compared with the control group; $\bar{x}\pm s$, $n=10$

2.6 EML单次给药对小鼠强迫游泳不动时间的影响

与溶剂对照组比较,DLX 20 mg/kg、EML 400 mg/kg可显著缩短小鼠强迫游泳不动时间,不动时间抑制率分别为38.1%、23.1% ($P<0.01$ 、 $P<0.05$,表6),提示EML具有抗抑郁作用。

2.7 EML单次给药对5-HTP诱导小鼠甩头行为的影响

与溶剂对照组相比,EML 100 mg/kg和DLX 20 mg/kg组可显著增加5-HTP(120 mg/kg)诱导小鼠甩头次数,甩头次数分别增加了40.7%、90.4% ($P<0.05$, $P<0.01$,表7),提示EML有增强5-HT能神经系统功能的作用。

表6 EML 单次给药对强迫游泳实验小鼠不动时间的影响
Tab.6 The immobility time in forced swimming test in mice after single administration of EML

组别	累计不动时间(s)
溶剂对照组	150±22.8
DLX 20 mg/kg	92.9±20.6**
EML(mg/kg)	
100	124.8±31.8
200	132.3±26.4
400	115.3±28.6 [†]

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与溶剂对照组比较; $\bar{x} \pm s$, $n=10$
[†] $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the vehicle group; $\bar{x} \pm s$, $n=10$

表7 EML 单次给药对5-HTP甩头实验小鼠甩头次数的影响
Tab.7 The number of head twiches of mice induced by 5-HTP after single administration of EML

组别	甩头次数
溶剂对照组	16.20±5.1
DLX 20 mg/kg	169.3±30.2**
EML(mg/kg)	
100	27.30±10.8 [†]
200	20.80±9.1
400	24.40±13.2

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与溶剂对照组比较; $\bar{x} \pm s$, $n=10$
[†] $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the vehicle group; $\bar{x} \pm s$, $n=10$

2.8 EML对育亨宾致小鼠毒性的影响

溶剂对照组小鼠_{sc}给予育亨宾 20 mg/kg 后 24 h 内死亡率为 0/10, 与溶剂对照组相比, DLX 20 mg/kg 显著增加了小鼠的死亡率($P < 0.01$), 而 EML 对小鼠的死亡率无显著性影响(表 8)。

表8 EML 单次给药对育亨宾毒性实验小鼠死亡率的影响
Tab.8 The death rate of mice in yohimbine toxicity test after single administration of EML

组别	育亨宾(20 mg/kg)	死亡率(%)
溶剂对照组	+	0
DLX 20 mg/kg	+	60**
EML (mg/kg)		
100	+	0
200	+	10
400	+	0

注: ** $P < 0.01$, 与溶剂对照组比较; $\bar{x} \pm s$, $n=10$
[†] $P < 0.01$, compared with the vehicle group; $\bar{x} \pm s$, $n=10$

2.9 EML对利血平化小鼠行为的影响

小鼠_{ip}给予利血平 1 h 后, 与溶剂对照组相比, 利血平模型组小鼠行为出现明显改变, 即眼睑下垂、体温降低和运动不能(不出圈率增加)($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), 表明利血平化模型成功。与模型组比较, DLX 对利血平引起的上述行为反应除运动不能外, 均有显著逆转作用($P < 0.01$, $P < 0.05$); EML 400 mg/kg 可显著减少小鼠眼睑下垂得分($P < 0.05$), 但对利血平化引起的体温降低和运动不能无显著影响; EML 100 mg/kg 和 200 mg/kg 对以上 3 项指标均无显著影响(表 9)。

表9 EML 单次给药对利血平实验小鼠眼睑下垂评分、体温降低和未出圈率的影响

Tab.9 The effects of EML on the reserpine-induced eye ptosis, hypothermia and akinesia in mice after single administration of EML

组别	眼睑下垂评分	未出圈率(%)	体温降低(°C)
溶剂对照组	0	0	-0.6±0.8
模型组	2.6±1.1**	70**	2.0±0.7 [†]
DLX 20 mg/kg	0.2±0.4**	70	1.1±0.5 [†]
EML(mg/kg)			
100	0.2±1.5	60	2.1±0.6
200	1.9±1.4	50	2.1±1.0
400	1.4±1.2 [†]	60	2.1±1.1

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与溶剂对照组比较; [†] $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the vehicle group; $\bar{x} \pm s$, $n=10$

[†] $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the model group; $\bar{x} \pm s$, $n=10$

3 讨论

现代药理学研究发现, 桑叶主要具有降血糖、降血脂、抗炎、抗氧化、抗焦虑和神经保护^[13]等作用。对于 EML 的抗抑郁作用仅有零星报道, 如 Metwally 等^[14]采用大鼠强迫游泳实验, 发现桑叶乙醇提取物能改善高胆固醇饮食大鼠的抑郁样行为。本研究旨在评价 EML 的抗抑郁作用, 并采用药理学模型对其作用机制进行初探。

本研究采用小鼠强迫游泳和悬尾两个行为绝望模型对 EML 的抗抑郁作用进行评价。该模型中, 小鼠在拼命挣扎试图逃脱而又无法逃脱后出现不动状态, 称之为绝望行为, 有效的抗抑郁剂可抑制这种绝望行为, 表现为不动时间的缩短^[2]。研究首先评价了 EML 连续给药 7 d 是否具有抗抑郁作用, 结果表明, EML 100 mg/kg 连续给药 7 d 可显著缩短

小鼠悬尾和强迫游泳不动时间,提示EML具有潜在的抗抑郁作用。进而评价了EML单次给药的抗抑郁作用,结果发现EML 400 mg/kg单次给药即可发挥抗抑郁作用。此外,由于具有中枢兴奋或抑制作用的药物亦可缩短或延长悬尾或游泳的不动时间,从而出现假阳性或假阴性结果^[16]。因此,本研究通过检测小鼠自发活动证明了EML无中枢兴奋或抑制的作用,排除了假阳性或假阴性结果的可能。以上结果提示,EML连续给药或单次给药,均可发挥抗抑郁效应。

抑郁症的单胺假说认为抑郁症的发生与脑内5-HT和(或)NE等单胺类神经递质降低有关。目前多数已上市抗抑郁药是在单胺假说的指导下研发,5-HT重摄取抑制剂、5-HT/NE双重重摄取抑制剂等一线抗抑郁药物均是通过增强单胺能神经系统功能发挥治疗作用^[17]。因此,本研究在确定EML具有抗抑郁作用的基础上,采用5-HTP诱导的甩头行为实验^[8]、育亨宾毒性增强实验^[9]和利血平拮抗实验^[18]3个药理学模型,初步评价EML发挥抗抑郁作用是否与激活单胺能神经系统有关。除上述3个模型外,药理学模型还包括高剂量阿朴吗啡拮抗实验、低剂量阿朴吗啡拮抗实验、大鼠色胺羟酶增强实验^[19-20]等,是最早用于评价抗抑郁药物作用的模型,目前多用于初步判断药物对单胺能系统的影响。

5-HTP是5-HT的前体,给予小鼠5-HTP后,其外源性5-HT水平增加,通过激动脑内5-HT₂受体引起小鼠甩头反应。能增强脑内5-HT能神经系统功能的抗抑郁剂可加强这种甩头行为^[21]。本研究中,EML 100 mg/kg增加了5-HTP诱导的甩头次数,提示EML抗抑郁作用可能与增加5-HT能系统的功能有关。

作为 α_2 受体拮抗剂的育亨宾与NE神经元突触前膜 α_2 受体结合后,阻断NE释放的负反馈机制,使NE大量释放,NE神经功能增强,表现为小鼠死亡率增加。当具有NE神经系统增强的抗抑郁剂与其合用后,NE能神经系统功能进一步增强,可显著增加育亨宾的致死作用^[22]。本研究显示,EML对育亨宾所致小鼠的死亡率无显著性影响,提示EML抗抑郁作用可能与NE能神经系统无关。

进而,本研究以利血平诱导的抑郁动物模型为研究对象,进一步验证EML抗抑郁的作用机制。利血平对包括NE、5-HT、DA在内的单胺能神经递质的囊泡摄取具有不可逆的抑制作用^[23]。由于其显著消耗大脑间隙的单胺类神经递质,利血平常被用

作建立抑郁症动物模型的工具,经利血平处理的动物出现上眼睑下垂、运动不能及体温下降的症状。有文献表明,拮抗利血平所致眼睑下垂的药物,可能具有增强5-HT神经功能的作用;拮抗体温下降的药物,可能具有增强NE神经功能的作用;拮抗运动不能的药物,可能具有增强中枢DA神经功能的作用^[19,24]。本实验结果显示,模型组小鼠经腹腔注射利血平后表现为眼睑下垂、运动不能及体温下降,与溶剂对照组相比,均有显著性差异,表明模型建立成功。EML高剂量组(400 mg/kg)对利血平模型引起的眼睑下垂有显著改善作用,但对运动不能和体温下降无显著影响,表明EML发挥其抗抑郁的作用主要通过增强5-HT能神经功能实现,对去甲肾上腺素和多巴胺系统无显著影响。这与在5-HTP诱导甩头行为实验和小鼠育亨宾毒性增强实验上所得的结果一致。

本课题组前期对多种化学药物和中药进行了抗抑郁作用的评价,发现单胺重摄取抑制剂类抗抑郁化药在行为绝望模型中多呈现良好的剂量依赖性,而中药复方或有效部位则多呈现U型曲线^[16],这可能与中药成分复杂以及多种成分存在相互作用有关,也可能与有效成分的药代动力学性质有关,此外,复杂的有效成分还可能存在不同的肠道代谢机制等^[25]。本研究发现,EML单次给药在行为绝望模型中的抗抑郁作用呈现了线性量效关系,但连续给药7 d呈现U型曲线的量效特点,提示EML发挥抗抑郁的作用可能较为复杂,随着给药时间的延长,多种成分可能都呈现出抗抑郁作用,但在不同的给药剂量,各成分间可能存在相加、增强、拮抗、相减等不同的相互作用,从而表现为在不同剂量的药效不同,U型量效的详尽机制需要后续实验数据支持,不在本文的研究范围。

综上,本研究首次发现EML具有潜在抗抑郁作用,其作用机制可能与增强5-HT能神经系统功能有关,深入的作用机制有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Disease GBD, Injury I, Prevalence C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015[J]. *Lancet*, 2016,388(10053): 1545-1602.
- [2] Deacon G, Kettle C, Hayes D, et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acids and the treatment of depression[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017,57(1): 212-223.

- [3] 王来海. 抑郁症治疗药物研究新进展[J]. 临床心身疾病杂志, 2004, 10(1): 70-72.
- [4] 时金臣, 陈子林. 郁证的中医发病机制与防治思路[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(101): 228.
- [5] 倪方平. 中医临床用桑叶加减治顽疾[J]. 药学与临床研究, 1998, 6(2): 64-65.
- [6] 李飞鸣, 张国平, 邹湘月. 桑叶黄酮类化合物研究进展[J]. 中国蚕业, 2015, 36(2): 1-4.
- [7] 张庆建, 赵毅民, 杨明. 黄酮类化合物对中枢神经系统的作用[J]. 中国中药杂志, 2001, 8(1): 5-8.
- [8] Corne SJ, Pickering RW, Warner BT. A method for assessing the effects of drugs on the central actions of 5-hydroxytryptamine [J]. *Br J Pharmacol*, 1963, 20(1): 106-120.
- [9] Bourin M. Is it possible to predict the activity of a new antidepressant in animals with simple psychopharmacological tests? [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 1990, 4(1): 49-64.
- [10] Askew BM. A simple screening procedure for imipramine-like drugs [J]. *Life Sci*, 1963, 10(10): 725-730.
- [11] Steru L. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. *Psychopharmacology*, 1985, 85(3): 367.
- [12] Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity [J]. *Psychopharmacology*, 2005, 177(3): 245-255.
- [13] Dong L, Yun K, Ji-Hae P, et al. Antidepressant-like effects of the ethyl acetate soluble fraction of the root bark of morus alba on the immobility behavior of rats in the forced swim test [J]. *Molecules*, 2014, 19(6): 7981-7989.
- [14] Metwally FM, Rashad H, Mahmoud AA. Morus alba L. Diminishes visceral adiposity, insulin resistance, behavioral alterations via regulation of gene expression of leptin, resistin and adiponectin in rats fed a high-cholesterol diet [J]. *Physiol Behav*, 2019, 201(1): 1-11.
- [15] Bai F, Li X, Clay M. Intra- and inter-strain differences in models of "behavioral despair". [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2001, 70(2): 187-192.
- [16] Wang QS, Ding SL, Mao HP. Antidepressant-like effect of ethanol extract from Zuojin Pill, containing two herbal drugs of Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae, is explained by modulating the monoaminergic neurotransmitter system in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(2): 603-609.
- [17] 施佳军. 抗抑郁药的七种作用机制[J]. 精神医学杂志, 1999, 12(4): 60-63.
- [18] Stehle G, Wunder A, Hannsjörg Sinn, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of new (Indol-3-yl)alkylamides and alkylamines acting as potential serotonin uptake inhibitors [J]. *Arzneimittelforsch*, 1999, 49(2): 96-105.
- [19] Grabowska M, Michaluk J, Antkiewicz L. Possible involvement of brain serotonin in apomorphine-induced hypothermia [J]. *Eur J Pharmacol*, 1973, 23(1): 82-89.
- [20] Ozaki M, Weissbach H, Ozaki A, et al. Monoamine oxidase inhibitors and procedures for their evaluation *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Med Pharm Chem*, 1960, 2(6): 591-607.
- [21] Thomas SJ, Shin M, McInnis MG, et al. Combination therapy with monoamine oxidase inhibitors and other antidepressants or stimulants: strategies for the management of treatment-resistant depression [J]. *Pharmacotherapy*, 2015, 35(4): 433-449.
- [22] Quinton RM. The increase in the toxicity of yohimbine induced by imipramine and other drugs in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 1963, 21(1): 51-66.
- [23] Baumeister AA, Hawkins MF, Uzelac SM. The myth of reserpine-induced depression: role in the historical development of the monoamine hypothesis [J]. *J Hist Neurosci*, 2003, 12(2): 207-220.
- [24] Olivia F. O'Leary, Bechtholt AJ, Crowley JJ, et al. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test [J]. *Psychopharmacology*, 2007, 192(3): 357-371.
- [25] Zhang K, Wang F, Yang JY, et al. Analysis of main constituents and mechanisms underlying antidepressant-like effects of Xiaochaihutang in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 175: 48-57.

(收稿日期: 2019-11-14 修回日期: 2020-02-26)

(上接第268页)

- [12] Man J, Yu X, Huang H, et al. Hypoxic induction of vasorin regulates notch1 turnover to maintain glioma stem-like cells [J]. *Cell stem cell*, 2018, 22(1): 104-118.
- [13] Jie X, Hua L, Jiang W, et al. Clinical application of a dendritic cell vaccine raised against heat-shocked glioblastoma [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 62(1): 91-99.
- [14] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response [J]. *Nature*, 2006, 444(7120): 756-760.
- [15] Jiang H, Dong L, Gong F, et al. Inflammatory genes are novel prognostic biomarkers for colorectal cancer [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(1): 368-380.
- [16] 林丽娜, 陈为, 王伟民, 等. miR-137对U87胶质瘤细胞中EZH2表达和细胞增殖的影响[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2011, 16(8): 362-365.
- [17] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Report of cancer incidence and mortality in China [J]. *Ann Transl Med*, 2014, 2(7): 61.
- [18] Wen LZ, Ding K, Wang ZR, et al. SHP-1 Acts as a tumor suppressor in hepatocarcinogenesis and HCC progression [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(16): 4680-4691.
- [19] Chen Z, Shojaee S, Buchner M, et al. Signalling thresholds and negative B-cell selection in acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Nature*, 2015, 534(7605): 138-145.

(收稿日期: 2019-12-14 修回日期: 2020-02-28)