

越鞠丸对抑郁症模型小鼠行为学、5-羟色胺及血浆皮质醇的影响

★ 闫东升 (张仲景国医学院, 湖北中医学院在职研究生 武汉 473003)
★ 周小琳 石和元 (湖北中医学院 2003 级硕士研究生 武汉 473003)
★ 丁凤敏 (湖北中医学院 2004 级硕士研究生 武汉 473003)
★ 指导: 王平 (湖北中医学院 武汉 473003)

摘要:目的: 观察越鞠丸对慢性轻度不可预见性的应激抑郁(CUMS)小鼠模型的影响, 揭示该方对抑郁症的药效及作用机理。方法: 实验分组: 健康昆明种小鼠随机分为 4 组, 即空白对照组(简称空白组)、模型组、阳性药物对照组(简称对照组)、越鞠丸组, 每组 12 只。越鞠丸组小鼠给予该方水煎液灌胃; 对照组予阿米替林等容积混悬液灌胃; 空白组、模型组均予等容积生理盐水灌胃, 连续 18 天。记录 5 分钟小鼠自主活动次数, 并记录 5 分钟内小鼠的激惹次数及检测 5-HT 的含量及血浆皮质醇浓度。结果: 越鞠丸组小鼠行为学指标明显改善, 疗效与对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。结论: 升高抑郁症模型小鼠脑组织中的 5-HT 含量, 降低血浆皮质醇含量是越鞠丸作用的部分机理。

关键词: 郁证; 越鞠丸; 抑郁症; 行为学指标; 5-羟色胺; 皮质醇

中图分类号: R 285.5 **文献标识码:** A

The Effect of Yueju Pill to the Ethology, 5-HT and Blood Plasm Cortisol of Depressive Disorder Mouse

YAN Dong-sheng¹, ZHOU Xiao-lin², SHI He-yuan², DING Feng-min²

1. Zhangzhongjing Nation Medical College, Master Postgraduate Student on the Job Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 473003;

2. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 473003

Abstract: Objective: Observe the effect of Yueju pill to chronic unpredictable mild stress(CUMS) mouse, to reveal the drug action and the mechanism of the medicine. Methods: Divide into groups: healthy kunming mouse were divide into 4 groups, that is blank control group(to abbreviate blank group), model, masculine drug group(to abbreviate control group) and Yueju pill group, 12 mouse per group. Yueju pill group were lavaged with the decoct of it, control group were labaged with amitriptyline, blank and model group were both lavaged with normal saline, continue 18 days. Record the autonomic activities frequency, and record irritation frequency in 5 minutes, and detect the content of 5-HT and plasma cortisol. Results: the index of ethology of mouse was improved treated with Yueju pill, contrast to the control group, the curative effect has no significant difference ($P < 0.05$). Conclusions: increasing the level of 5-HT of brain tissue in depressive disorder mouse and decreasing the content of plasma cortisol may be the mechanism of Yueju pill.

Key words: Depressed Syndrome; Yueju Pill; Depressive Disorder; the index of ethology; 5-HT; Cortisol

抑郁症属中医“郁证”范畴, 为情感性疾病, 症见情绪低落、思维迟缓和运动性抑制, 严重时可出现自杀观念及行为。在临床实践中, 我们运用越鞠丸治疗本病, 疗效确切。为进一步验证其疗效, 探讨其作用机理, 我们建立了慢性轻度不可预见性的应激抑郁(CUMS)小鼠模型, 运用随机对照分组原则, 通过对其行为学、脑组织 5-羟色胺、血浆皮质醇等指标的检测, 以先进的检测方法和指标检测, 观察越鞠丸对实验动物的影响, 并分别与阳性药相对照, 旨在观察越鞠丸治疗抑郁症的效果, 并以期揭示其作

用机理。

1 实验材料

1.1 实验动物

健康昆明种小鼠, 48 只, 体重(20 ± 2)g, 雌雄各半。实验动物及饲料由华中科技大学实验动物中心提供。

1.2 实验药物

越鞠丸: 由苍术、香附、川芎、神曲、栀子组成, 药品均来自湖北中医学院专家门诊药房。按人与动物表面积折算法, 算得小鼠等效剂量为每公斤体重 13

g 生药,用 5 倍于药材的冷水浸泡 20 分钟,然后用文火煎煮 30 分钟,滤出药渣,然后浓缩成每毫升含生药 1.3 g 浓度的药液,置于冰箱内 0~4 ℃ 保存备用。

阳性对照药:阿米替林 常州第四制药厂生产,批号:20040421。

1.3 实验试剂和仪器

1.3.1 试剂 5-HT:sigma 公司提供。皮质醇放射免疫分析试剂盒:北京北方生物技术研究提供。甲醇、磷酸二氢钾、三乙胺等其他试剂均为国产分析纯。

1.3.2 仪器 抖笼、BL-410 生物机能实验系统,由成都泰盟仪器公司生产。Waters 高效液相色谱仪,美国。色谱条件:色谱柱为 4 mm×150 mm, Nova-pak C₁₈, 5 μm,流动相为含 0.1 mol/L KH₂PO₄、10 mmol/L 的三乙胺缓冲液和 1% 的甲醇,流速 1 mL/min。柱温 40 ℃。Waters 515 HPLC Pump(美国)、Waters 2487 紫外检测器(美国)、GL-20G-II 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂生产)、WKY II 微量移液器(上海荣泰生化工程有限公司生产)。

2 实验方法

2.1 动物分组与饲养

健康昆明种小鼠 48 只,放置动物房适应环境 2 天,自由进食饮水,自然光照,普通饲料喂养,然后按体重随机分为 4 组,即空白对照组(简称空白组)、模型组、阳性药物对照组(简称对照组)、越鞠丸组,每组 12 只。

2.2 造模方法

除空白组外其余均单笼喂养,按照文献^[1]略加改进,将 30 分钟行为限制、4 ℃ 冰水游泳 5 分钟、停水 24 小时、停食 24 小时、夹尾 1 分钟、明暗颠倒 24 小时、摇晃 5 分钟(160 Hz)、40 ℃ 环境 5 分钟、噪音 5 分钟等 9 种刺激随机安排到 18 日内,每日 1 种,使动物不能预料刺激的发生。

2.3 给药方法

造模 18 天后,越鞠丸组小鼠分别给予该方水煎液按 13 g/(kg·d)灌胃,0.1 mL/10g;对照组予阿米替林 10 mg/(kg·d)等容积混悬液灌胃;空白组、模型组均予等容积生理盐水灌胃,连续 18 天。

2.4 行为学检测

给药后的第一天开始进行自主活动的检测。采用抖笼实验,用一弹性适中的弹簧,将抖笼悬挂在铁架上,笼子下端用一细线与换能器相连,用 BL-410 生物机能实验系统记录小鼠的活动情况。实验时,每只小鼠放入抖笼内,先适应 2 分钟后,记录 5 分钟

小鼠自主活动次数,记波峰和波谷的次数,小波<2 mm 忽略不记,并记录 5 分钟内小鼠的激惹次数,即记录高耸尖峰的次数。

2.5 标本采集

实验结束后,实验动物断头采血 2 mL/只,按常规方法分离血浆。迅速取出全脑,去小脑后称重,按每克 10 mL 的比例加入预冷的 PBS 溶液,玻璃匀浆器匀浆,4 ℃ 1200 r/min 离心 15 分钟,取上清液 0.5 mL。-20 ℃ 冷冻保存待测。

2.6 指标检测

2.6.1 5-HT 的含量用高效液相技术进行检测 在样品中加入 0.5 mL 的 0.4 mol/L 高氯酸(内含 0.02% 的 VitC),15 000 r/min 高速冷冻离心 15 分钟,取上清液 20 μL 进样测定,含量以 ng/g 脑组织浓度表示。本实验采用高效液相色谱法测定大鼠下丘脑 5-HT 的含量。参考文献方法^[2]配制流动相:称取 6.8 g 磷酸二氢钾用水溶解并稀释至 500 mL 配制成 0.1 mol/L 的磷酸二氢钾溶液。按甲醇与磷酸二氢钾 1:9 的比例加入 55 mL,超声脱气后 20 分钟后备用,每次进样后先用纯水冲洗 20~30 分钟,再用 40% 的甲醇冲洗 30 分钟使极性小的化合物不再残留于色谱柱内里,加入 VitC 降低高氯酸对 5-HT 的氧化作用。所有的操作要保证在 4 ℃ 下进行。

2.6.2 血浆皮质醇浓度采用放射免疫法测定 结果以每毫升血浆所含皮质醇(ng/mL)表示。具体实验操作按照试剂盒说明书进行。

3 统计学处理

所有检测结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学分析。两组间比较采用 *t* 检验。

4 实验结果

4.1 造模后一般情况

实验期间,每 6 日测一次体重,每 3 日用量筒初步测量一次糖水消耗量。模型组小鼠在 18 天不同方法的刺激下普遍出现少动、快感缺乏(糖水消耗明显减少)、易激惹、毛色发黄、缺乏光泽、体重减轻。空白组小鼠活泼、食欲旺盛、毛色光亮,小鼠体重增长比其他各组略快,糖水消耗量最多,实验结束时平均体重超出其他组,糖水平均消耗量高于其他组。而模型组小鼠平均体重最轻,糖水消耗量最少。但经统计学处理后,在各个阶段,包括治疗后,各组小鼠间均无显著差异。

4.2 越鞠丸对抑郁证模型小鼠行为学的影响

4.2.1 对小鼠自主活动行为的影响 见表 1。

表 1 各组小鼠自主活动次数的比较

组别	n	小鼠自主活动次数/次·(5min) ⁻¹
空白组	12	401.00 ± 37.36
模型组	12	79.68 ± 46.30 ^{△△}
对照组	12	223.25 ± 30.79 ^{△△▲▲}
越鞠丸组	12	279.36 ± 56.87 ^{△△▲▲}

注:与空白组比较,△△ $P < 0.01$;与模型组比较,▲▲ $P < 0.01$ 。

从表 1 可知,与空白组比较,模型组小鼠自主活动明显减少($P < 0.01$);与模型组比较,越鞠丸组及对照组小鼠自主活动有显著性增加($P < 0.01$);越鞠丸组与对照组比较小鼠自主活动无显著差异($P > 0.05$)。

4.2.2 对小鼠激惹次数的影响 见表 2。

表 2 各组小鼠激惹次数的比较

组别	n	小鼠激惹次数/次·(5min) ⁻¹
空白组	12	0
模型组	12	6.87 ± 0.68 ^{△△}
对照组	12	1.23 ± 0.35 ^{△△▲▲}
越鞠丸组	12	0.56 ± 0.12 ^{△△▲▲☆☆}

注:与空白组比较,△△ $P < 0.01$;与模型组比较,▲▲ $P < 0.01$;与对照组比较,☆☆ $P < 0.01$ 。

表 2 的结果表明,与空白组比较,模型组小鼠激惹次数明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,越鞠丸组及对照组小鼠的激惹次数有显著性减少($P < 0.01$);越鞠丸组、空白组与对照组小鼠的激惹次数比较均有显著性差异($P < 0.01$)。

4.3 越鞠丸对抑郁模型小鼠脑组织 5-HT 含量的影响

见表 3。

表 3 各组小鼠脑中 5-HT 含量的比较

组别	n	5-HT 含量/μg·g ⁻¹
空白组	12	1423.23 ± 148.96
模型组	12	765.26 ± 135.89 ^{△△}
对照组	12	1300.58 ± 186.43 ^{▲▲}
越鞠丸组	12	1420.40 ± 156.37 ^{▲▲}

注:与空白组比较,△△ $P < 0.01$;与模型组比较,▲▲ $P < 0.01$ 。

表 3 结果表明:与空白组比较,模型组小鼠 5-HT 含量明显减少($P < 0.01$);与模型组比较,越鞠丸组及对照组小鼠 5-HT 含量有显著性增加($P < 0.01$);越鞠丸组与对照组比较小鼠 5-HT 含量无显著差异($P > 0.05$)。

4.4 越鞠丸对抑郁模型小鼠血浆皮质醇的影响

见表 4。

表 4 结果表明:与空白组比较,模型组小鼠血浆皮质醇浓度明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,越鞠丸组和对照组的小鼠血浆皮质醇浓度均有显著降低差异($P < 0.01$);越鞠丸组的小鼠血浆皮质醇浓度比较对照组无明显差异($P > 0.05$)。

表 4 各组小鼠血浆皮质醇浓度的比较

组别	n	血浆皮质醇/μg·ml ⁻¹
空白组	12	51.26 ± 11.25
模型组	12	82.21 ± 6.21 ^{△△}
对照组	12	55.84 ± 2.69 ^{▲▲}
越鞠丸组	12	53.11 ± 9.56 ^{▲▲}

注:与空白组比较△△ $P < 0.01$;与模型组比较▲▲ $P < 0.01$ 。

5 讨论

5.1 动物模型评价

由于抑郁症是一个包括了身体和心理异常的疾病,因此对抑郁症的动物模型争议非常大,所以对抑郁模型的进一步研究显得尤为迫切。到目前为止,已有 20 多种方法可以用作抑郁症动物模型的制备,分别从生物学、遗传学、社会心理学等各角度来模拟抑郁症的表现。分为^[3]应激模型、神经生化功能改变模型、转基因动物模型、孤养或分养模型等。

慢性轻度不可预见性的应激抑郁模型(CUMS),该模型模拟了人类抑郁的核心症状即快感缺乏,同时也模拟了其他重型抑郁障碍的症状表现,故 CUMS 具有较高的有效性,并可持续几个月,基本符合抑郁模型的要求,是目前国内外文献中广泛使用的模型。

我们采用慢性应激抑郁模型,不同程度地表现出情感活动异常,这反映了动物具有类似人类抑郁症患者表现的神经系统症状,如易怒、焦虑、淡漠等。易怒与淡漠的同时出现是一种抑郁症的混合性发作^[4],也就是目前发作以躁狂和抑郁症状混合状态或迅速交替(即在数小时内)为特征,而且至少有一次发作符合某一型抑郁标准或躁狂标准。

本实验中 CUMS 模型的小鼠变得激惹、开笼或触笼时有明显的攻击行为,对新异环境刺激反应淡漠。说明本法建立的模型有类似抑郁症的行为变化。在抖笼实验过程中抑郁模型小鼠出现的宽波次数明显减少,这说明抑郁模型小鼠自主活动明显减少;而在较长时间的直线(不动状态)后突然出现高而尖的波峰这种现象明显增多,并且此类小鼠放入抖笼时撕咬笼具,我们认为这种现象表明抑郁模型小鼠变得激惹、攻击行为增强。因此从行为学的角度佐证了 CUMS 抑郁模型的复制成功。

本实验结果显示:模型组小鼠脑组织 5-HT 含量明显下降($P < 0.01$),符合较公认的 5-HT 神经递质学说^[3],也从神经生化方面佐证了慢性应激抑郁小鼠模型的复制成功。

5.2 5-羟色胺(5-HT)与抑郁症

抑郁症发病机制尚不十分清楚,但生化机制的假说较多,其中较公认的观点为 5-HT 是抑郁症发

病中重要的神经递质。5-HT 又称血清素,是机体重要的神经介质之一,参与情感、睡眠、警觉、记忆、食欲和性功能的调节^[5],与人类的行为有密切关系。1965 年 Coppen, Shaw 等人提出缺乏 5-HT 可能引起抑郁^[6],进一步支持抑郁症发病的 5-HT 能神经功能低下的假说。各种选择性 5-HT 再摄取抑制剂(如氟西汀等)的抗抑郁疗效也进一步证实该假说,支持了 5-HT 能神经功能低下作为抑郁症神经生物学标志的可能性。李云辉等^[7]对绝望大鼠模型脑组织和血浆中 5-HT 含量的测定,也发现模型对照组大鼠脑组织和血浆 5-HT 含量低于正常对照组,认为 5-HT 是抑郁症发病中重要的神经递质,5-HT 的降低可引起抑郁发作。因而,提高 5-HT 的含量,使之稳定平衡,是抗抑郁的重要环节之一。

本实验结果发现慢性应激抑郁模型小鼠脑中 5-HT 的含量明显降低,也就是说,造模后的动物出现的自主活动减少、攻击行为、糖水消耗量降低可能与 5-HT 的含量降低有关,与经典的抑郁症发病的 5-HT 神经低下相吻合。实验结果还显示越鞠丸能有效提高小鼠脑内的 5-HT,越鞠丸组与模型组比较有显著差异($P < 0.01$),与空白组比较无明显差异($P > 0.05$),提示本方能提高脑内 5-HT 的含量,有较好的抗抑郁作用。而阳性药物对照组与越鞠丸组比较无明显差异($P > 0.05$),提示该药在提高 5-HT 含量的功效上与越鞠丸无明显差异,但该药在改善抑郁症其他症状方面起效慢,并具有明显的副作用,特别是有一定的心脏毒性,药物依从性差。而中药副作用较小,因此治疗抑郁症在疗效无差别的情况下可首选中药。越鞠丸能增高慢性应激抑郁模型小鼠脑中 5-HT 的含量,可见该方提高 5-HT 含量,可能为其抗抑郁作用的重要环节之一。由于中药方剂具有多成分、多靶点的作用特性,故在以后的研究中可对越鞠丸中具有抗抑郁作用的活性部位,活性成分及其它抗抑郁机理进行进一步的深入研究。

5.3 皮质醇与抑郁症

5-HT 假说是目前比较公认的抑郁症发病机理假说,5-HT 是诊断抑郁症的重要指标之一,但它的检测方法十分复杂,较难在临床开展,而皮质醇的检测在临床上应用广泛、方法成熟,且皮质醇与抑郁症有较好的相关性,对诊断和排除抑郁症都有较高的参考价值。

既往研究表明,抑郁症与皮质醇有密切关系:抑郁症病人的脑脊液、血浆和尿皮质醇升高;用地塞米松不能抑制血液中的皮质醇,且不抑制的程度与抑

郁严重度相关联。皮质醇升高对神经递质的效应:

(1)降低 5-HT 能神经功能:皮质醇升高能诱导肝脏色氨酸吡咯化酶,降解血液中的色氨酸,色氨酸是 5-HT 的前体,其降低可致 5-HT 合成不足,5-HT 合成不足可引起抑郁症及其相关症状,后者包括自杀、强迫、慢性疼痛和睡眠障碍等^[8]。5-HT 能合成不足还可以①降低中枢 NE 能、C-氨基丁酸能和增加乙酰胆碱能;②降低褪黑激素、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、生长素(GH)、催乳素(PRL)和升高促甲状腺激素释放激素(TRH),故抑郁症的这些生化指标可有相应异常。

(2)降低 NE 能:皮质醇升高能诱导肝脏酪氨酸氨基转移化酶,降解血液中的酪氨酸。酪氨酸是 NE 的前体,其降低可减少 NE 合成,NE 合成减少可引发抑郁症及其相关症状,后者包括嗜睡、精神运动性阻滞、认知障碍和快感缺失等。

(3)升高多巴胺(DA)能神经功能:皮质醇升高能增加 DA 能(Schatzberg, 1985),而 DA 能增加与精神病症状相关联,故抑郁症病人常伴有精神病性症状^[9],而精神病性抑郁的地塞米松抑制试验(DST)阳性率也很高(70%)。

本实验结果显示:模型组的血浆皮质醇浓度明显高于空白组,证明了抑郁症与皮质醇升高的相关性;越鞠丸组小鼠的血浆皮质醇浓度明显低于模型组,可见其治疗的作用机理可能与升高血浆皮质醇有关,越鞠丸在降低血浆皮质醇的功效上与阿米替林无显著性差别。

参考文献

- [1] Murua Vs, Gomez RA, Andrea Me et al. Shuttle-box deficits induced by chronic variable stress; reversal by imipramine administration [J]. Pharmacology Biochemistry & Behavior, 1991, 38: 125~130
- [2] 黄建国, 徐幸民, 印道春. 高效液相色谱-紫外光检测法测定血清 5-羟色胺 [J]. 宁夏医学杂志, 2002, 24(12): 745
- [3] 郭建友, 李昌煜, 葛卫红. 抑郁证动物模型研究进展 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(10): 1932~1933
- [4] Evins AE. Efficacy of new anticonvulsant medications in bipolar spectrum mood disorders [J]. J Clin Psychiatry, 2003, 64(suppl8): 9
- [5] 李焕德, 彭文兴. 抑郁症药物治疗新进展 [J]. 国外医学. 精神病学分册, 1997, 24(3): 129~133
- [6] 蔡悼基. 抑郁症基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 1997, 29~32
- [7] 李云辉, 胡随瑜, 向群辉, 等. 天松 I 号对绝望大鼠模型行为及脑组织血浆 5-羟色胺 1 多巴胺的影响 [J]. 湖南中医学院学报, 2002, 9(22): 13~15
- [8] Lucki I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin [J]. Biol Psychiatry, 1998, 44: 151~162
- [9] Van Eerdewegh. Schizo-affective disorder: bipolar-unipolar subtyping natural history variable [J]. Journal of Affective Disorders, 1987, 12: 223~232

(收稿日期: 2006-11-06)