

基于抗抑郁活性的百合地黄汤中生地黄与百合的 配比优选及其机制

弓明珠, 张月月*, 宋玲玲, 王怡婷, 王君明, 王彦媚, 巫晓慧, 杨启铃
(河南中医药大学药学院, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**基于抗抑郁活性优选百合地黄汤中生地黄与百合的最佳配比并初探其可能的机制。**方法:**100只雄性小鼠随机分为正常组、模型组、生地黄单煎液组、百合单煎液组、5种不同配比的百合地黄汤组(生地黄-百合5:6、5:5、5:4、5:3、5:2)、盐酸氟西汀组。除正常组外,其余9组,连续21 d,采用慢性不可预知性温和应激法(CUMS)制备抑郁小鼠模型。生地黄单煎液组、百合单煎液组和5种不同配比的百合地黄汤组均以 $2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 分别灌胃相应的药物,盐酸氟西汀组灌胃盐酸氟西汀 $0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,正常组和模型组分别灌胃等体积生理盐水,连续21 d。通过行为学实验评价不同配比的百合地黄汤的抗抑郁作用;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织脑源性神经营养因子(BDNF)和酪氨酸激酶受体B(TrkB)的表达水平;羟胺法检测海马组织总超氧化物歧化酶(SOD)的水平;分光光度法检测海马组织还原型谷胱甘肽(GSH)的水平;比色法检测海马组织谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)和谷胱甘肽S转移酶(GST)的水平;硫代巴比妥酸法检测海马组织丙二醛(MDA)的水平,初探其抗抑郁机制。**结果:**CUMS引起了糖水偏爱率显著下降及强迫游泳和悬尾不动时间均显著延长($P<0.01$);而不同配比的百合地黄汤及生地黄、百合的单煎液均在不同程度上明显逆转了上述指标的异常($P<0.05$, $P<0.01$),尤以配比为5:6时对上述指标的影响最为明显;此外,CUMS引起了小鼠海马BDNF和TrkB的表达水平及SOD、谷胱甘肽抗氧化相关指标水平均显著降低($P<0.01$),脂质过氧化产物MDA水平显著升高($P<0.01$),而较优比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)及生地黄、百合的单煎液均在不同程度上明显逆转了以上指标的异常($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**5种不同配比的百合地黄汤及生地黄、百合的单煎液均能产生抗抑郁作用,尤以生地黄-百合配比为5:6时抗抑郁作用最强,且随着百合在方中占比减少,抗抑郁作用逐渐减弱,其机制可能涉及增强海马中枢神经营养水平和抗氧化防御能力。

[关键词] 百合地黄汤; 最佳配比; 抗抑郁; 神经营养; 氧化/抗氧化失衡

[中图分类号] R2-0;R33;G289;R971+43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)21-0058-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222038

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220811.1802.003.html>

[网络出版日期] 2022-08-12 14:13

Optimal Ratio of Rehmanniae Radix and Lilii Bulbus in Baihe Dihuangtang Based on Antidepressant Activity and Its Mechanism

GONG Mingzhu, ZHANG Yueyue*, SONG Lingling, WANG Yiting, WANG Junming, WANG Yanmei,
WU Xiaohui, YANG Qiling
(College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** Based on the antidepressant activity, the optimal ratio of Rehmanniae Radix and Lilii Bulbus in Baihe Dihuangtang was optimized and its possible mechanism was preliminarily explored. **Method:** A total of 100 male mice were randomly divided into normal group, model group, Rehmanniae Radix single decoction group, Lilii Bulbus single decoction group, and 5 different ratios of Baihe Dihuangtang group (Rehmanniae Radix-Lilii Bulbus 5:6, 5:5, 5:4, 5:3, 5:2), fluoxetine hydrochloride group. Except for the

[收稿日期] 2022-03-24

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81773928);河南中医药大学大学生创新学习项目(YXCX[2020]5)

[第一作者] 弓明珠,在读硕士,从事中药药性药效机制、毒效相关性及安全性评价研究,E-mail:g18860392303@163.com

[通信作者] *张月月,助理实验师,从事中药药性药效机理研究工作,E-mail:yyjm2012@126.com

normal group, the remaining 9 groups were treated with chronic unpredictable mild stress method (CUMS) for 21 consecutive days to establish the depression mouse model. The Rehmanniae Radix single decoction group, Lilii Bulbus single decoction group and 5 different ratios of Baihe Dihuangtang group were administered with corresponding drugs at a dose of $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ respectively, and fluoxetine hydrochloride group was administered fluoxetine hydrochloride at a dose of $0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, the normal group and the model group were respectively given an equal volume of normal saline by gavage for 21 consecutive days. The antidepressant effect of Baihe Dihuangtang with different ratios was evaluated by behavioral experiments. Western blot was used to detect the expression levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase receptor B (TrkB) in hippocampus. The level of total superoxide dismutase (SOD) in hippocampus was detected by hydroxylamine method. The level of reduced glutathione (GSH) in hippocampus was detected by spectrophotometric method. The levels of glutathione peroxidase (GPX) and glutathione S-transferase (GST) in hippocampus was detected by colorimetric method. The level of malondialdehyde (MDA) in hippocampus was detected by thiobarbituric acid method, and preliminary exploration of its antidepressant mechanism. **Result:** CUMS caused a significant decrease in the preference rate of sugar water and a significant prolongation of forced swimming and tail suspension immobility time ($P < 0.01$), while the different ratios of Baihe Dihuangtang and the single decoction of Rehmanniae Radix and Lilii Bulbus were significantly reversed to varying degrees. Abnormalities of the above indicators were observed ($P < 0.05$, $P < 0.01$), especially when the ratio of 5:6 had the most obvious effect on the above indicators, Moreover, CUMS caused the hippocampal BDNF and the expression of TrkB, SOD and glutathione antioxidant-related indexes were significantly decreased ($P < 0.01$), and the levels of lipid peroxidation product MDA was significantly increased ($P < 0.01$). However, the superior ratio of Baihe Dihuangtang (Rehmanniae Radix-Lilii Bulbus 5:6, 5:5, 5:4) and the single decoction of Rehmanniae Radix and Lilii Bulbus significantly reversed the abnormality of the above indicators to varying degrees ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** In summary, 5 different ratios of Baihe Dihuangtang and the single decoction of Rehmanniae Radix and Lilii Bulbus can produce antidepressant effect, especially when the ratio of 5:6 had the most obvious effect on the above indicators, and the antidepressant effect gradually weakens with the proportion of Lilii Bulbus in the recipe decreases, and its mechanism may involve enhancing the nutritional level and antioxidant defense ability of hippocampal central nervous system.

[Keywords] Baihe Dihuangtang; best ratio; antidepressant; neurotrophic; oxidation/antioxidant imbalance

抑郁症是一种以快感缺失、行动迟缓、行为绝望等为主要特征的情感障碍性疾病,在中医中归属为“郁证”“百合病”等范畴^[1],具有发病率高、致残率高、致死率高之三高不下的巨大社会危害^[2-4]。百合地黄汤是医圣张仲景《金匮要略》中记载的经方,由生地黄和百合2味药组成,具有养阴清热、润养心肺的功效,是现代临床治疗抑郁症的基础方剂。临床和临床前的报道显示,百合地黄汤具有防治抑郁症的作用^[5-11]。由于医圣时代度量衡尚不统一,方中用量存在较大争议^[12],医圣名方百合地黄汤也不例外,加之百合病与抑郁症并不等同,医圣原方的配比未必适合抑郁症的治疗需求,因此,基于抗抑郁活性优选百合地黄汤中生地黄与百合2味药物组成的最佳配比,对于推进百合地黄汤在防治抑郁症方

面的科学合理应用,意义重大。鉴于目前对百合地黄汤抗抑郁作用的药物组成配比优选尚未见报道,本研究选用国际公认的慢性不可预知性温和应激(CUMS)抑郁模型及行为学测试^[13-15],旨在优选百合地黄汤中生地黄与百合的最佳配比,并初探其抗抑郁的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级昆明雄性小鼠100只,体质量18~22 g,3~4周龄,购于河南省实验动物中心,动物合格证号SCXK(豫)2017-0001,饲养温度(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $60\% \pm 5\%$,小鼠可自由饮水摄食,笼具独立并定期消毒。本研究动物实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会审查批准,批准号DWLL201903531。

1.2 药物 生地黄 60 g(产地河南,批号 210201),百合 50 g(产地湖南,批号 21021905),由河南中医药大学药学院陈随清教授鉴定,分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的干燥块根及百合科植物卷丹 *Lilium lancifolium* 的干燥肉质鳞叶;盐酸氟西汀(上海源叶生物科技有限公司,批号 Y08M10C8 7320)。

1.3 试剂 RIPA 组织/细胞裂解液,4×蛋白质上样缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20210408、20210526、20210608);脑源性神经营养因子(BDNF)抗体、酪氨酸激酶受体 B(TrkB)抗体、p-TrkB 抗体(美国 Gene Tex 公司,批号分别为 9400423001、42879、821904131); β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)偶联亲和纯山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国 Proteintech 公司,批号分别为 109639、20000311);Omni-ECL 超灵敏化学发光检测试剂盒(上海雅酶生物科技有限公司,批号 01571086);考马斯亮蓝蛋白试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、总超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)试剂盒、谷胱甘肽 S 转移酶(GST)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20210429、20200709、20210429、20210508、20210524、20200928)。

1.4 仪器 TGL-16M 型高速冷冻离心机(常州金坛良友仪器有限公司);JX-FSTPRP-48 型全自动样品快速研磨仪(上海净信科技有限公司);Epoch 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);KQ-500DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Trans-Blot Turbo™ 全能型转印系统(美国 Bio-Rad 公司);Tanon-5200 全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 生地黄与百合不同配比的百合地黄汤的制备

参考 2020 年版《中华人民共和国药典》^[16]中生地黄和百合的用量,其中生地黄用量为 10~15 g,百合用量为 6~12 g,据此用量可计算出生地黄与百合的配比范围应为 10:12~15:6,即 5:6~5:2。取适量的生地黄、百合或不同质量配比(生地黄-百合 5:6、5:5、5:4、5:3、5:2),加入 10 倍体积水,浸泡 30 min,武火煮沸后文火继续煎煮 1.5 h,获得水煎液,将药材残渣加入 6 倍体积水继续煎煮,合并 2 次水煎液,浓缩至药液质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,将以上所制备的药液,封瓶后放入冰箱备用。

2.2 动物分组、造模与给药 小鼠适应性喂养 7 d 后,将小鼠随机分为 10 组,即正常组、模型组、生地黄单煎液组、百合单煎液组、5 种不同配比的百合地黄汤组(生地黄-百合 5:6、5:5、5:4、5:3、5:2)、盐酸氟西汀组($0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组 10 只。生地黄单煎液、百合单煎液、不同配比百合地黄汤(生地黄-百合 5:6、5:5、5:4、5:3、5:2),以及阳性药盐酸氟西汀均用 0.9% 生理盐水配制而成。其中,生地黄单煎液、百合单煎液、以及生地黄与百合不同配伍的百合地黄合煎液(百合地黄汤)的剂量均以生药(配伍组以百合与生地黄的生药量之和)计,并按临床等效剂量的约 1 倍剂量计^[16],均为 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。正常组小鼠不接受任何刺激,其余各组小鼠每天随机给予 1 种刺激,连续 21 d,同 1 种刺激累计使用不超过 3 次,包括(4±2) °C 冰水浴 5 min、禁食 24 h、超声 3 h、水平摇晃 10 min、潮湿垫料 24 h、夹尾 1 min、(45±2) °C 热刺激 5 min、禁水 24 h,从而制备 CUMS 抑郁样小鼠模型。在刺激 2 h 后以 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量灌胃给药,正常组、模型组分别给予相同体积的生理盐水,时间为上午 9:00 至上午 11:00,1 次/d,连续 21 d。

2.3 行为学检测

2.3.1 蔗糖偏爱实验 蔗糖偏爱实验开始前对小鼠进行 3 d 适应性训练,第 1 天每笼小鼠同时放置 2 瓶 1% 蔗糖溶液,第 2 天用纯净水替换其中 1 瓶蔗糖溶液,第 3 天禁水禁食 24 h。适应性训练结束后,第 4 天上午 9 点进行蔗糖偏爱实验,每笼分别放置 1 瓶纯净水和 1 瓶 1% 蔗糖溶液,24 h 后将取下所有水瓶称质量,并使用以下公式计算糖水偏爱率:糖水偏爱率=糖水消耗量(g)/[糖水消耗量(g)+纯净水消耗量(g)]×100%。

2.3.2 强迫游泳实验 将小鼠逐个放置在装有 15 cm 自来水[水温(25±2) °C]的透明中圆柱形筒中,游泳时长为 6 min,由对实验分组全然不知且训练有素的观察员记录后 4 min 的不动时间,即小鼠在水中漂浮而不挣扎,仅做轻微的动作以保持头部高于水面。

2.3.3 悬尾实验 在安静的环境中,用胶带在距离小鼠尾尖 1 cm 处,将小鼠倒置悬挂在离地面 50 cm 的固定杆上。在 6 min 的实验过程中,由对实验分组全然不知且训练有素的观察员记录后 4 min 的不动时间,即四肢完全不动或间歇性轻微摆动。

2.4 小鼠海马组织样本的采集 行为学结束后,通过颈椎脱臼的方法处死小鼠后,于冰台上迅速取出

各组海马组织, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织中BDNF、TrkB、p-TrkB的蛋白表达 精密称量海马组织,按比例加入RIPA裂解液,匀浆15~20 s后冰上静置10 min,重复操作3次,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径8.1 cm)后取上清。用BCA蛋白定量法并调至等浓度后,进行SDS-PAGE电泳,将充分分离的蛋白转移至PVDF膜,用5%脱脂奶粉室温封闭2 h。封闭后倒入一抗BDNF(1:1 500), TrkB(1:1 000), p-TrkB(1:1 000), β -actin(1:2 500) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, TBST缓冲液洗4次,每次10 min,加入二抗(HRP标记的羊抗兔IgG, 1:5 000)室温孵育1 h。TBST缓冲液洗4次,每次10 min,加ECL超灵敏化学发光液在全自动发光图像分析系统下检测特异性免疫反应蛋白条带。利用Tanon图像软件分析条带灰度值,计算各个目的蛋白与相应的内参蛋白灰度值之比。

2.6 多种试剂盒法检测海马组织中SOD、MDA、GSH、GPX、GST的水平 精密称取各组小鼠海马组织,制成10%的海马组织匀浆液。用生理盐水将10%的海马组织匀浆液稀释至1%。严格按照考马斯亮蓝试剂盒说明书检测海马中待测蛋白的含量,用于后续计算。接下来,取1%的海马组织匀浆液,严格按照试剂盒说明书羟胺法检测海马匀浆液的吸光度 A ,并按公式除以上述所测海马组织的蛋白含量,计算海马组织中SOD水平;取以上制备好的10%的海马组织匀浆液,分别严格按照试剂盒说明书硫代巴比妥酸(TBA)法、分光光度法、比色法分别检测海马组织匀浆液,并按公式除以上述所测海马组织的蛋白含量,分别计算海马组织中MDA、GSH、GPX和GST水平。

2.7 统计学分析 采用SPSS 25.0软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),若方差齐性,采用最小显著性差异法(LSD),若方差不齐性,采用Dunnett's T_3 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对CUMS诱导的抑郁小鼠行为学的影响 与正常组比较,模型组小鼠糖水偏爱率显著下降($P < 0.01$)、强迫游泳和悬尾实验的不动时间显著延长($P < 0.01$),提示造模成功;与模型组比较,给予5种不同配比百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4、5:3、5:2)及生地黄、百合的单煎液、盐酸氟西汀分别干预后在不同程度上均显著升高了糖水偏爱率

和明显缩短了强迫游泳和悬尾实验的不动时间($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中5种配比的百合地黄汤干预后的逆转率,比逆转率更高的单煎液(百合单煎液)的分别高出24.7%、23.5%、17.4%、1.7%、1.7%(对糖水偏爱率),9.3%、9.0%、6.7%、1.5%、1.7%(对强迫游泳不动时间),以及9.4%、9.2%、7.2%、1.3%、2.3%(对悬尾不动时间);此外,3种不同配比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)干预后,对上述指标的影响3组之间相比差异均无统计学意义;给予2种不同配比的百合地黄汤(生地黄-百合5:3、5:2)干预后,与以上3种不同配比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)对小鼠糖水偏好率的影响相比显著优于2种不同配比的百合地黄汤(生地黄-百合5:3、5:2)($P < 0.01$),而对上述指标在此2组之间比较差异均无统计学意义;就对糖水偏好率、强迫游泳和悬尾的不动时间的逆转率而言,均尤以配比为5:6的百合地黄汤逆转率为最高,依次为33.0%、27.6%、36.1%。见表1。

3.2 对CUMS诱导的抑郁小鼠海马组织BDNF/TrkB通路蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马组织中BDNF蛋白表达显著降低($P < 0.01$)、TrkB磷酸化水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,3种较优配比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)及生地黄、百合的单煎液、盐酸氟西汀分别干预后在不同程度上均明显升高了BDNF蛋白表达和TrkB磷酸化水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中3种较优配比的百合地黄汤分别干预后的逆转率,比逆转率更高的单煎液(百合单煎液)的分别高出58.7%、58.7%、56.5%(对BDNF蛋白表达水平),97.2%、100%、94.3%(对TrkB磷酸化水平);此外,3种较优比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)分别干预后,上述指标在此3组之间互相比均无显著差异,而以配比为5:6的百合地黄汤对BDNF蛋白表达水平的逆转率87.0%为最高,以配比5:5的百合地黄汤对TrkB磷酸化水平的逆转率165.7%为最高。见图1和表2。

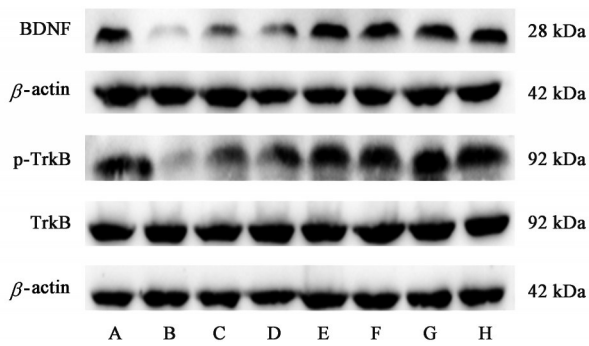
3.3 对CUMS诱导的抑郁小鼠海马组织脂质过氧化和抗氧化水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马中的脂质过氧化产物MDA水平显著升高($P < 0.01$),主要抗氧化酶SOD水平显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,3种较优配比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)及生地黄、百合的单煎液、盐酸氟西汀分别干预后在不同程度上降低了MDA水平和显著升高了SOD水平($P < 0.05$, $P <$

表1 生地黄与百合不同配比的百合地黄汤对CUMS诱导的抑郁小鼠行为学的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Baihe Dihuangtang with different ratios of Rehmanniae Radix and Lilii Bulbus on behavior of CUMS-induced depression in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	糖水偏爱率/%	强迫游泳不动时间/s	悬尾不动时间/s
正常组		64.8±5.7	44.3±11.8	78.7±18.0
模型组		42.1±4.4 ²⁾	82.7±16.6 ²⁾	139.1±24.0 ²⁾
生地单煎液组	2	45.5±3.1 ³⁾	69.0±18.6 ³⁾	104.8±11.9 ³⁾
百合单煎液组	2	45.6±3.6 ³⁾	67.6±15.2 ³⁾	101.9±12.9 ³⁾
百合地黄汤(生地黄-百合5:6)组	2	56.0±3.1 ^{4,6)}	59.9±11.4 ⁴⁾	88.9±21.0 ⁴⁾
百合地黄汤(生地黄-百合5:5)组	2	55.5±3.2 ^{4,6)}	60.1±11.3 ⁴⁾	89.1±23.6 ⁴⁾
百合地黄汤(生地黄-百合5:4)组	2	52.9±1.9 ^{4,6)}	62.0±9.3 ⁴⁾	91.9±14.4 ⁴⁾
百合地黄汤(生地黄-百合5:3)组	2	46.3±3.9 ^{3,8,10,12)}	66.3±15.8 ³⁾	100.2±13.1 ³⁾
百合地黄汤(生地黄-百合5:2)组	2	46.3±3.4 ^{3,8,10,12)}	66.2±11.4 ³⁾	98.8±9.4 ³⁾
盐酸氟西汀组	0.01	55.9±2.7 ^{4,6)}	48.9±17.2 ^{4,6,12)}	81.10±17.3 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与百合单煎液组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与百合地黄汤(生地黄-百合5:6)组比较⁷⁾ $P<0.05$,⁸⁾ $P<0.01$;与百合地黄汤(生地黄-百合5:5)组比较⁹⁾ $P<0.05$,¹⁰⁾ $P<0.01$;与百合地黄汤(生地黄-百合5:4)组比较¹¹⁾ $P<0.05$,¹²⁾ $P<0.01$ (表2-表4同)



注:A.正常组;B.模型组;C.生地黄单煎液组;D.百合单煎液组;E.百合地黄汤(生地黄-百合5:6)组;F.百合地黄汤(生地黄-百合5:5)组;G.百合地黄汤(生地黄-百合5:4)组;H.盐酸氟西汀组

图1 CUMS诱导的抑郁小鼠海马组织BDNF/TrkB信号通路蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of BDNF/TrkB signal pathway protein expression in hippocampus of CUMS-induced depression mice

0.01),其中3种较优比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)分别干预后的逆转率,比逆转率更高的单煎液(百合单煎液)分别高出53.1%、51.1%、47.5%(对MDA水平),35.2%、34.5%、28.8%(对SOD水平)。此外,3种较优比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)干预后,海马MDA、SOD水平在此3组之间相比均差异无统计学意义,但就对海马MDA、SOD水平的逆转率而言,均以配比5:6的百合地黄汤的逆转率为最高,依次为63.7%、47.0%。见表3。

3.4 对CUMS诱导的抑郁小鼠海马谷胱甘肽相关的抗氧化水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠

表2 生地黄与百合不同配比的百合地黄汤对CUMS诱导的抑郁小鼠海马组织BDNF/TrkB信号通路蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Baihe Dihuangtang with different ratio of Rehmanniae Radix and Lilii Bulbus on BDNF/TrkB signal pathway protein in hippocampus of CUMS-induced depression mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BDNF/ β -actin	p-TrkB/TrkB
正常组		0.88±0.01	0.98±0.04
模型组		0.46±0.03 ²⁾	0.35±0.02 ²⁾
生地黄单煎液组	2	0.58±0.01 ³⁾	0.57±0.02 ³⁾
百合单煎液组	2	0.59±0.01 ³⁾	0.58±0.01 ³⁾
百合地黄汤(生地黄-百合5:6)组	2	0.86±0.02 ^{4,6)}	0.93±0.03 ^{4,6)}
百合地黄汤(生地黄-百合5:5)组	2	0.86±0.03 ^{4,6)}	0.92±0.02 ^{4,6)}
百合地黄汤(生地黄-百合5:4)组	2	0.85±0.05 ^{4,5)}	0.91±0.03 ^{4,6)}
盐酸氟西汀组	0.01	0.88±0.03 ^{4,6)}	0.93±0.02 ^{4,6)}

海马谷胱甘肽抗氧化指标GSH、GPX、GST水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,3种较优配比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)及生地黄、百合的单煎液及盐酸氟西汀分别干预后均明显升高了GSH、GPX、GST的水平($P<0.05, P<0.01$),其中3种较优比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)分别干预后的逆转率,比逆转率更高的单煎液(生地黄单煎液)分别高出75.9%、75.1%、67.2%(GSH水平),24.6%、25.7%、22.5%(GPX水平),26.7%、29.6%、22.5%(GST水平);此外,3种较优比

表3 生地黄与百合不同配比的百合地黄汤对CUMS诱导的抑郁小鼠海马组织脂质过氧化和抗氧化水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Baihe Dihuangtang with different ratios of Rehmanniae Radix and Lili Bulbus on lipid peroxidation and antioxidant levels in hippocampus of CUMS-induced depression mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MDA /μmol·g ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹
正常组		4.14±1.42	210.81±21.13
模型组		15.51±2.39 ²⁾	133.92±13.22 ²⁾
生地黄单煎液组	2	13.94±0.96 ³⁾	147.29±16.41 ³⁾
百合单煎液组	2	13.94±0.65 ³⁾	149.76±7.30 ³⁾
百合地黄汤(生地黄-百合5:6)组	2	5.63±1.77 ^{4,6)}	196.89±18.08 ^{4,6)}
百合地黄汤(生地黄-百合5:5)组	2	5.94±1.61 ^{4,6)}	195.97±12.12 ^{4,6)}
百合地黄汤(生地黄-百合5:4)组	2	6.50±1.35 ^{4,6)}	188.32±13.84 ^{4,6)}
盐酸氟西汀组	0.01	5.49±1.41 ^{4,6)}	199.57±9.80 ^{4,6)}

的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)分别干预后,海马GSH、GPX和GST水平在此3组之间互相比较差异均无统计学意义,而以配比为5:6的百合地黄汤对海马GSH水平的逆转率90.5%为最高,且均以配比5:5的百合地黄汤对海马GPX和GST水平的逆转率为最高,依次为64.8%、46.9%。见表4。

4 讨论

抑郁症与《金匱要略》所记载的百合病症状相似,患者以精神恍惚、神志不定为主要症状^[17]。百合地黄汤是治疗百合病的专用方,方中百合清心安神、养阴润肺,生地黄清热生津、滋阴凉血,两药合用,使心肺烦躁之热得清,脑神得安,阴阳得平^[16]。尽管临床应用和动物研究均表明百合地黄汤可用

于治疗抑郁症^[7],但鉴于目前对百合地黄汤中生地黄与百合的配比优选尚未见报道,因此,本研究在CUMS抑郁模型上首次优选百合地黄汤中生地黄与百合抗抑郁作用的最佳配比,并证实了百合地黄汤中生地黄与在配比为5:6~5:2及生地黄、百合的单煎液均能产生抗抑郁作用,且在不同配比的百合地黄汤中随着百合用量减少,抗抑郁作用逐渐减弱,其中尤以配比为5:6时抗抑郁作用最强,其抗抑郁机制可能涉及增强海马中枢神经营养水平和抗氧化防御能力。

考虑到国际公认的CUMS抑郁模型可以较好的模拟抑郁症患者的核心症状,如快感缺失、行为绝望^[18-20],而蔗糖偏爱实验、强迫游泳实验和悬尾实验是被广泛用于评价药物抗抑郁效果的行为学测试^[21]。蔗糖偏爱实验中的糖水偏爱率可代表快感缺失行为,这是人类严重抑郁症的主要症状^[22]。强迫游泳和悬尾实验中的不动时间可作为评价抑郁症中的绝望行为^[23]。因此,本研究在CUMS抑郁模型上首次优选百合地黄汤中生地黄配伍百合抗抑郁作用的最佳配比。本研究结果表明,CUMS连续21 d使小鼠糖水偏爱率显著降低,强迫游泳和悬尾实验的不动时间分别显著升高,表明CUMS导致小鼠的抑郁样行为,这与文献报道的结果一致或基本一致^[24]。给予5种不同配比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4、5:3、5:2)及生地黄、百合的单煎液分别干预后,均在不同程度显著逆转了上述指标的异常,表明百合地黄汤在配比为5:6~5:2及生地黄、百合的单煎液均在不同程度上产生抗抑郁作用。就不同配比的百合地黄汤而言,给予这3种配比(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)的合煎液的抗抑郁作用均分别优于以下2种配比的百合地黄汤(生地黄-百合5:3、5:2),尤以配比5:6的百合地黄汤抗抑

表4 生地黄与百合不同配比的百合地黄汤对CUMS诱导的抑郁小鼠海马组织谷胱甘肽相关的抗氧化水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Baihe Dihuangtang with different ratio of Rehmanniae Radix and Lili Bulbus on glutathione related antioxidant level in hippocampus of CUMS-induced depression mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GSH/μmol·g ⁻¹	GPX/U·mg ⁻¹	GST/U·mg ⁻¹
正常组		90.99±6.09	92.97±13.61	148.80±28.62
模型组		47.33±2.96 ²⁾	53.65±13.28 ²⁾	86.70±8.96 ²⁾
生地黄单煎液组	2	53.89±4.32 ³⁾	73.31±6.89 ³⁾	101.12±7.91 ³⁾
百合单煎液组	2	54.22±4.07 ³⁾	74.62±4.64 ³⁾	107.71±9.24 ³⁾
百合地黄汤(生地黄-百合5:6)组	2	90.17±7.09 ^{4,6)}	87.84±7.69 ^{4,6)}	124.87±9.65 ^{4,6)}
百合地黄汤(生地黄-百合5:5)组	2	89.78±8.52 ^{4,6)}	88.44±7.12 ^{4,6)}	127.40±13.90 ^{4,6)}
百合地黄汤(生地黄-百合5:4)组	2	86.06±7.02 ^{4,6)}	86.70±7.31 ^{4,5)}	121.24±10.45 ^{4,6)}
盐酸氟西汀组	0.01	89.90±5.75 ^{4,6)}	88.52±7.14 ^{4,6)}	129.69±9.40 ^{4,6)}

郁作用更佳,且在不同配比的百合地黄汤中随着百合在方中占比减少,抗抑郁作用逐渐减弱。此外,在本研究中,百合单煎液的抗抑郁作用优于生地黄单煎液,现代研究报道毛蕊花糖苷具有明确的抗抑郁活性,潘文超等^[25]发现毛蕊花糖苷在百合水煎液中含量大于生地黄水煎液,因此毛蕊花糖苷的含量差异可能是百合单煎液的抗抑郁作用优于生地黄单煎液的原因之一。

研究表明,神经营养因子假说可能是抑郁症主要的发病机制之一^[26]。BDNF和TrkB是神经营养因子家族中重要的成员,广泛分布于中枢神经系统^[27]。临床和动物研究均表明,许多抑郁症患者或动物的体内BDNF及其受体TrkB水平降低^[28-29],抗抑郁药治疗可上调BDNF/TrkB信号通路的相关蛋白表达^[30]。因此,本研究选取不同配比的百合地黄汤在行为学测试中改善抑郁样行为较优的3种较优配比的百合地黄汤组(生地黄-百合5:6、5:5、5:4),进一步探讨了不同配比的百合地黄汤的抗抑郁作用机制。结果表明,CUMS诱导的小鼠海马中BDNF及其受体TrkB的蛋白表达分别显著降低,这与文献报道的结果一致或基本一致^[31]。相反,给予3种较优配比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)及生地黄、百合的单煎液分别干预后,均在不同程度上逆转了上述指标的异常,表明百合地黄汤中生地黄与百合的抗抑郁机制可能与上调海马BDNF/TrkB信号通路关键蛋白表达有关。

越来越多的研究表明,中枢氧化损伤可能是导致抑郁症的主要原因,而增加抗氧化水平对改善抑郁症具有重要作用^[32]。另有研究发现,抑郁症患者大多伴有脂质过氧化水平的升高和抗氧化酶活性的下降,抗抑郁药治疗后可以降低至正常水平^[33-34]。鉴于此,本研究从脂质过氧化和抗氧化的方面进一步探讨了百合地黄汤中生地黄与百合的抗抑郁作用机制。结果显示,CUMS诱导的小鼠海马产生脂质过氧化损伤,表现在MDA水平显著升高,而给予3种较优配比的百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)及生地黄、百合的单煎液分别干预后,均在不同程度上显著逆转了MDA水平的升高,且尤以配比为5:6的百合地黄汤逆转幅度为最明显,表明给予不同配比的百合地黄汤均在不同程度上发挥清除氧自由基和抑制海马脂质过氧化的作用。另外,本研究中,CUMS诱导的小鼠海马中SOD、GSH、GPX、GST水平分别显著降低,这与文献报道的结果一致或基本一致^[35]。相反,给予3种较优配比的

百合地黄汤(生地黄-百合5:6、5:5、5:4)及生地黄、百合的单煎液分别干预后,均在不同程度上显著逆转了上述指标的异常,提示不同百合地黄汤中生地黄与百合的抗抑郁机制可能与抗氧化防御上调有关。这些发现综合表明百合地黄汤中生地黄与百合的抗抑郁作用机制可能与减轻海马脂质过氧化和增强抗氧化防御有关。

综上所述,本研究在CUMS抑郁症模型上首次证实了百合地黄汤中生地黄与百合在配比为5:6~5:2及生地黄、百合的单煎液均能产生抗抑郁作用,尤以配比为5:6的百合地黄汤的抗抑郁作用最强,且在不同配比的百合地黄汤中随着百合在方中占比减少,抗抑郁作用逐渐减弱,其抗抑郁机制可能涉及增强海马中枢神经营养水平和抗氧化防御能力及抑制中枢脂质过氧化损伤。本研究首次考察优选百合地黄汤中生地黄与百合抗抑郁作用的最佳配比,并初探其可能的作用机制,以期为推动医圣名方百合地黄汤的科学、准确、高效、合理的应用助力。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 姜雅琴,介勇,徐阿红. 中医论治抑郁症的研究进展[J]. 中医临床研究,2021,13(17):142-144.
- [2] MOUSSAVI S, CHATTERJI S, VERDES E, et al. Depression, chronic diseases, and decrements in health: Results from the world health surveys [J]. Lancet,2007,370(9590):851-858.
- [3] GUTIERREZ-ROJAS L, PORRAS-SEGOVIA A, DUNNE H, et al. Prevalence and correlates of major depressive disorder: A systematic review [J]. Braz J Psychiatry,2020,42(6):657-672.
- [4] HAMMEN C. Risk factors for depression: An autobiographical review [J]. Annu Rev Clin Psychol,2018,14:1-28.
- [5] 郭利红,姚华强,康震. 百合地黄汤治疗更年期抑郁症的临床疗效及对内分泌系统的影响[J]. 中医药导报,2016,22(8):70-72.
- [6] 张芳. 百合地黄汤治疗脑卒中后抑郁症的分析[J]. 中国医药指南,2019,17(7):159-160.
- [7] 管家齐,焦悦. 百合地黄汤临床应用与实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志,2009,19(5):322-323.
- [8] 全世建. 百合地黄汤加减治疗抑郁症30例疗效观察[J]. 新中医,1999(2):17-18.
- [9] 赵洪庆,刘检,孟盼,等. 百合地黄汤对焦虑性抑郁模型大鼠海马突触可塑性的影响[J]. 中国中药杂志

- 志, 2021, 46(5): 1205-1210.
- [10] 赵洪庆, 唐林, 吴碧茹, 等. 百合地黄汤抑制 NLRP3 炎症小体激活改善焦虑性抑郁症模型大鼠海马神经元损伤[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20): 7-14.
- [11] 管家齐, 孙燕, 陈海伟. 百合地黄汤对小鼠抑郁症模型的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(6): 1875-1877.
- [12] 丁腾, 孙宇宏, 杜霞, 等. 经典名方百合地黄汤的化学成分与网络药理学研究[J]. 中草药, 2019, 50(8): 1848-1856.
- [13] 李杉杉, 刘新民, 王琼. 基于文献数据库的慢性不可预见性温和应激诱发抑郁症动物模型研究[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 77-83.
- [14] 纪雅菲, 芮翊馨, 方洋, 等. 逍遥散正丁醇部位基于 IGF-1R β /PI3K/Akt 信号通路的抗抑郁作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(14): 1-11.
- [15] 凌志峰, 罗洪斌, 谢枫枫, 等. 柴胡越鞠汤对 CUMS 诱导的抑郁症模型大鼠治疗作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(21): 68-76.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 129-130, 137-138.
- [17] 程瑶. 百合地黄汤研究进展[J]. 光明中医, 2012, 27(3): 618-620.
- [18] ANTONIUK S, BIJATA M, PONIMASKIN E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 99: 101-116.
- [19] HASSAN M M, GAB A M, MENZE E T, et al. Protective effects of morin against depressive-like behavior prompted by chronic unpredictable mild stress in rats: Possible role of inflammasome-related pathways[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 180: 114140.
- [20] HUANG X, LI W, YOU B, et al. Serum metabonomic study on the antidepressant-like effects of ellagic acid in a chronic unpredictable mild stress-induced mouse model[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(35): 9546-9556.
- [21] 陈丽艳, 陈雨竹, 宓月光, 等. 栀子豉汤及其固体发酵菌质对 CUMS 大鼠抗抑郁作用对比研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19): 5044-5051.
- [22] 牟雄军, 刘昊, 林宁, 等. 疏肝和胃汤及其有效物质部位对抑郁模型大鼠下丘脑内多种神经递质含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(15): 3343-3348.
- [23] 陶伟伟, 白子君, 岳启予, 等. 栀子豉汤对慢性应激诱导的抑郁模型小鼠脑组织神经炎症和突触可塑性的影响[J]. 中医杂志, 2022, 63(11): 1073-1079.
- [24] 王上, 董文娟, 刘鹏亮, 等. JAK2-STAT3 信号通路在天麻素改善小鼠抑郁样行为中的作用研究[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(19): 3622-3627.
- [25] 潘文超, 潘瑾, 薛晓燕, 等. 百合地黄汤现代方化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(8): 1884-1888.
- [26] CASTREN E, MONTEGGIA L M. Brain-derived neurotrophic factor signaling in depression and antidepressant action[J]. *Biol psychiatry*, 2021, 90(2): 128-136.
- [27] 王钦, 蔡萧君, 李宇, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对慢性应激抑郁大鼠海马 BDNF/TrkB/CREB 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 37-46.
- [28] SHELDRICK A, CAMARA S, ILIEVA M, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT3) levels in post-mortem brain tissue from patients with depression compared to healthy individuals—a proof of concept study [J]. *Eur Psychiatry*, 2017, 46: 65-71.
- [29] 程潇, 董子源, 陈颖, 等. 解郁止痛方对偏头痛-抑郁共病模型大鼠海马组织中 BDNF/TrkB 表达的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(4): 66-71.
- [30] 袁志鹰, 李哲, 林美好, 等. 百合鸡子汤通过 BDNF/TrkB 介导的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对 CUMS 大鼠抗抑郁的影响[J]. 中成药, 2021, 43(3): 778-782.
- [31] ZHANG S S, TIAN Y H, JIN S J, et al. Isoflurane produces antidepressant effects inducing BDNF-TrkB signaling in CUMS mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2019, 236(11): 3301-3315.
- [32] 薛亚兰, 许晶廷, 邱继红. 淫羊藿苷对抑郁症大鼠抑郁样行为和神经元损伤的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(20): 2152-2156.
- [33] WANG J, CHEN R, LIU C, et al. Antidepressant mechanism of catalpol: Involvement of the PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 signaling pathway in rat hippocampus[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 909: 174396.
- [34] WU X, WANG J, SONG L, et al. Catalpol weakens depressive-like behavior in mice with streptozotocin-induced hyperglycemia via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Neuroscience*, 2021, 473: 102-118.
- [35] 张天艺. 开心散对抑郁症合并心肌缺血模型大鼠的保护作用研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.

[责任编辑 孙丛丛]