

青阳参总苷对慢性不可预知轻度应激大鼠的抗抑郁作用

于彩媛¹, 李宁², 张建军^{2*}

(1. 国家开放大学, 北京 100039; 2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所, 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室, 北京 100050)

[摘要] **目的:**本研究评价了青阳参总苷(QYS)在慢性不可预知轻度应激(CUMS)大鼠模型上的抗抑郁活性,并通过研究其对大鼠脑内单胺神经递质浓度的影响探讨QYS的作用机制。**方法:**将Wistar大鼠随机分为6组,分别为正常组、模型组、氟西汀组和QYS低、中、高剂量组(0.625, 2.5, 10 mg·kg⁻¹),每组9只。随机给予21 d不可预知刺激建立抑郁症模型,建模同时ig给予相应药物。造模结束后,采用旷场实验观察QYS对大鼠自主活动的影响,采用悬尾实验、强迫游泳实验观察QYS的抗抑郁作用,采用高效液相-电化学检测法测定大鼠脑内单胺递质去甲肾上腺素(NE),5-羟色胺(5-HT)及多巴胺(DA)的浓度。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠悬尾时间及大鼠强迫游泳的不动时间明显延长,自主活动时间明显减少;大鼠脑内额叶皮层中NE,5-HT及DA的浓度明显降低,均具有明显的统计学差异($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,QYS(0.625, 2.5, 10 mg·kg⁻¹)能够显著缩短模型大鼠悬尾实验中的不动时间,QYS高剂量组显著缩短模型组大鼠强迫游泳实验中的不动时间,QYS在旷场实验中对模型组大鼠的自主活动无明显影响,QYS高剂量组显著升高模型组大鼠脑内额叶皮层中NE,5-HT及DA的浓度。**结论:**QYS高剂量对模型抑郁大鼠具有良好的抗抑郁活性,其抗抑郁作用机制可能是QYS提高了模型大鼠脑内额叶皮层NE及5-HT水平。

[关键词] 抗抑郁; 慢性应激; 青阳参总苷; 自主活动; 单胺递质

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0087-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130087

Effect of Qingyangshenylycosides on Depression in Chronic Unpredictable Mild Stress Rats YU Cai-yuan¹, LI Ning², ZHANG Jian-jun^{2*} (1. *The Open University of China, Beijing 100039, China*; 2. *Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antidepressant activity of qingyangshenylycosides (QYS) in the chronic unpredictable mild stress rats (CUMS), and to explore its mechanism by the comparison of concentration of monoamine neurotransmitters in brain tissue. **Method:** A total of 54 male adult Wistar rats were randomly assigned into 6 groups: the normal group, the model group, the fluoxetine group, the low-, medium-and high-dose QYS groups (0.625, 2.5, 10 mg·kg⁻¹) of 9 rats each. The CUMS model was induced in rats by receiving unpredictable mild stress for 21 days. Meanwhile, the corresponding medicines were intragastrically administered to rats. The antidepressant effects of QYS on CUMS rats were evaluated by using the tail suspension test, forced swimming test and open field test. The concentrations of monoamines in rat brain including noradrenaline (NE), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and dopamine (DA) were determined by using high-performance liquid chromatograph with electrochemical detection method. **Result:** Compared with the normal group, the immobility time in tail suspension and forced swimming test increased, the autonomic activities decreased, the concentrations of NE, 5-HT and DA in frontal cortex decreased in the model group. Compared with model group, the immobility time in the tail suspension and forced swimming test decreased, the autonomic activities increased, the concentrations of NE, 5-HT increased in the high-dose QYS group ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

[收稿日期] 20150310(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173111,81173529)

[第一作者] 于彩媛, 硕士, 讲师, 从事药理学远程教育工作, Tel:010-57519224, E-mail: yucy@crtvu.edu.cn

[通讯作者] *张建军, 硕士, 研究员, 从事神经精神药理学研究工作, Tel:010-63182392, E-mail: jjzhang@imm.ac.cn

Conclusion: QYS at $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ produced reliable antidepressant effect in CUMS rats. The mechanism may be related to improving the concentrations of NE and 5-HT in the CUMS rat brain.

[Key words] antidepressant effect; chronic unpredictable mild stress; qingyangshenlycosides; locomotor activity; monoamine neurotransmitters

抑郁症是一种慢性的反复发作的精神疾病,心境低落是主要临床特征,大约有 15% 的抑郁症患者有自杀倾向。世界卫生组织预测,2020 年抑郁症将成为最重要的致残疾病之一。关于抑郁症的发病机制有许多观点和假说,其中单胺假说被专家广泛认同,单胺假说认为抑郁症是大脑内去甲肾上腺素(NE),5-羟色胺(5-HT)及多巴胺(DA)等单胺递质功能缺陷所致,临床上多数抗抑郁药的作用机制是通过增加突触中单胺递质水平发挥作用的^[1]。

青阳参总苷(QYS)是萝藦科鹅绒属植物青阳参(*Cynanchum otophyllum*)根粉提取物。有研究显示 QYS 对大鼠有明显的抗惊厥和抗癫痫的作用^[2]。有研究显示青阳参抗癫痫的作用与升高小鼠大脑半球和脑干内 5-HT^[3]有关,这与抗抑郁药的作用机制一致^[4]。目前还没有关于 QYS 抗抑郁的作用及其机制的系统研究。本研究通过给予大鼠 21 d 不可预知轻度应激(CUMS)制备抑郁症模型,观察 QYS 对抑郁大鼠的行为改善作用,通过研究 QYS 对抑郁大鼠脑内单胺递质的影响探索其抗抑郁作用机制。

1 材料

1.1 动物 54 只健康清洁级成年雄性 Wistar 大鼠,体重 200 ~ 220 g,SPF 级,北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号 SCXK(京)2002-0003。

1.2 药品及试剂 青阳参总苷液:将青阳参总苷粉末(医科院药物研究所植化室提供)溶于 1.5% 聚山梨酯-80 的生理盐水。氟西汀(美国礼来制药,批号 A142174),实验前以生理盐水溶解配药。去甲肾上腺素(批号 LOT 100K1484),多巴胺(批号 110K2505),5-羟色胺(批号 43F-7045),均购于美国 Sigma 公司。各对照品配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓储备液,用时稀释成终质量浓度为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。流动相:无水乙酸钠 8.2 g,柠檬酸 17.86 g,乙二胺四乙酸(EDTA)- $\text{Na}_2(2\text{H}_2\text{O})$ 74.4 mg,甲醇 170 mL,辛烷基磺酸钠 100 mg,正二丁胺 100 μL ,加双蒸水至 1 L。

1.3 仪器 大鼠行为观察敞箱(自制),7125 型六通进样阀(美国 Rheodyne 公司), C_{18} 固相色谱柱(天津试剂二厂)。

2 方法

2.1 抑郁症模型制备 取大鼠随机分为 6 组,分别为正常组,模型组(CUMS 组),氟西汀组($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),QYS 高、中、低剂量组($0.625, 2.5, 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组 9 只。正常组正常摄食饮水,不给予任何刺激。其他 5 组分别接受 21 d 不可预知的刺激。建模第 1 天开始,氟西汀组和 QYS 组 *ig* 给药 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,正常组和模型组则给予蒸馏水。应激方式按李婧等^[5]的方法稍作改进,随机给予动物 24 h 禁食;24 h 禁水;4 $^{\circ}\text{C}$ 冷水游泳 5 min;40 $^{\circ}\text{C}$ 热水游泳 5 min;1 min 夹尾;30 min 高速水平震荡;30 min 足底电击。每天的刺激以随机方式给予,连续 21 d。造模后,先后进行旷场实验、悬尾实验、强迫游泳实验测试,实验同时正常给药。

2.2 悬尾实验^[6] 将大鼠尾部距末端 1.5 cm 处用胶布固定悬挂,使其头朝下,距地面 50 cm。大鼠表现为被动悬挂,肢体运动消失时被认定为不动状态。悬尾 6 min,记录后 4 min 内的累积不动时间。

2.3 强迫游泳实验^[7] 正式强迫游泳实验前 24 h 进行预游泳实验,将大鼠放入水温 26 $^{\circ}\text{C}$,水深 20 cm,直径 20 cm,高 80 cm 玻璃缸内游泳 15 min。次日进行正式实验,大鼠放入与预游泳相同的环境中,大鼠表现为被动漂浮,挣扎行为消失持续 3 s 被认定为不动状态。计算 5 min 内大鼠强迫游泳的累计不动时间。

2.4 旷场实验(OFT)^[8] 采用 72 cm \times 72 cm \times 60 cm 箱体,箱底划分为 25 个面积相等的方格。将大鼠放置于敞箱的正中格内,观察大鼠 5 min 活动情况。测定指标:①大鼠穿越箱底方格总数(三爪以上跨入临格次数);②直立次数(两前肢向上抬起离开箱底面或攀附在侧壁上,以后肢支撑使身体竖立的次数)。

2.5 取样 行为学实验后,迅速断头取脑,全脑置于冰板上,并分离出额叶皮层,去除脑膜和血管,称重后置于液氮中迅速冷冻,后置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏。

2.6 单胺类递质 NE,5-HT 及 DA 测定 用高效液相-电化学检测法测定^[9]。样品处理:将大鼠脑额叶皮层放入一定体积的 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸溶液中,并加入适量内标。匀浆,离心(4 $^{\circ}\text{C}$,14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,

20 min), 吸取上清液, 加入 1/2 体积的钾盐溶液 (含柠檬酸钾 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, EDTA $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 混合, 冰浴静置 10 min, 离心 (同前)。取上清液 $50 \mu\text{L}$ 注入色谱系统分析。将对照品与内标 (与样品中加入量相同) 定量混合, 作为标准对照, 比较组织样品与标准对照品中的相应物质与内标的峰高比, 估计组织中相应物质含量 ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿组织)。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 20 软件进行统计学分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差分析和 Dunnett's *t*-检验进行多组统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CUMS 大鼠悬尾不动时间的影响 悬尾实验结果显示, 与正常组比较, 模型组悬尾不动时间明显延长 ($P < 0.01$), 氟西汀能显著缩短模型组大鼠悬尾不动时间, 缩短率为 127.5%; QYS (0.625, 2.5, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 均能不同程度的缩短 CUMS 大鼠的悬尾不动时间 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 缩短率分别为 65.3%, 80.3%, 98.9%, 各剂量组间无统计学差异。见表 1。

表 1 QYS 对 CUMS 大鼠悬尾不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)
Table 1 Effects of QYS on immobility time in tail suspension test in CUMS rats ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	不动时间/s	改善率/%
正常	-	95.2 ± 6.4	-
模型	-	$141.3 \pm 6.5^{1)}$	-
氟西汀	2.5	$82.5 \pm 12.1^{3)}$	127.5
QYS	0.625	$111.2 \pm 11.0^{2)}$	65.3
	2.5	$104.3 \pm 10.0^{2)}$	80.3
	10	$95.7 \pm 11.0^{3)}$	98.9

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 CUMS 大鼠强迫游泳不动时间的影响 强迫游泳结果显示, 模型大鼠与正常组比较, 强迫游泳不动时间明显延长 ($P < 0.05$), 氟西汀能显著缩短模型大鼠的强迫游泳不动时间 ($P < 0.01$), 缩短率为 191.5%; QYS ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 能显著缩短模型大鼠的强迫游泳不动时间 ($P < 0.05$), 缩短率为 102.8%, 各剂量组间无统计学差异。见表 2。

3.3 对 CUMS 大鼠自主活动的影响 OFT 结果显示, 模型大鼠与正常组比较, 总走格数与直立数明显减少 ($P < 0.01$), 氟西汀能显著增加模型大鼠的总走格数 ($P < 0.05$), 但对直立数影响不大, QYS

(0.625, 2.5, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 对模型大鼠的总走格数和站立数均影响不大, 没有统计学差异。见表 3。

表 2 QYS 对 CUMS 大鼠强迫游泳不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)
Table 2 Effects of QYS on immobility time in forced swimming test in CUMS rats ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	不动时间/s	改善率/%
正常	-	126.0 ± 14.2	-
模型	-	$176.4 \pm 13.2^{1)}$	-
氟西汀	2.5	$79.9 \pm 14.3^{3)}$	191.5
QYS	0.625	151.3 ± 23.2	49.8
	2.5	154.3 ± 13.9	43.8
	10	$124.6 \pm 13.4^{2)}$	102.8

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

表 3 QYS 对 CUMS 大鼠自主活动的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)
Table 3 Effects of QYS on locomotor activity in open field test in CUMS rats ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	总走格数/次	直立数/次
正常	-	73.4 ± 9.8	17.1 ± 3.4
模型	-	$12.9 \pm 2.9^{1)}$	$3.3 \pm 0.8^{1)}$
氟西汀	2.5	$40.2 \pm 9.6^{2)}$	6.2 ± 1.6
QYS	0.625	14.8 ± 8.2	3.1 ± 1.2
	2.5	21.0 ± 10.0	4.0 ± 1.4
	10	20.6 ± 6.2	2.4 ± 0.5

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 对 CUMS 大鼠脑内额叶皮层单胺递质的影响 实验结果显示, 模型组大鼠额叶皮层中 NE, DA 及 5-HT 含量显著降低 ($P < 0.05$), 氟西汀显著增加模型大鼠脑内额叶皮层中 NE, DA 及 5-HT 的浓度 ($P < 0.05$), 而 QYS ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 能显著增加模型大鼠脑内额叶皮层 NE 和 5-HT 的浓度 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 QYS 对 CUMS 大鼠脑内额叶皮层单胺递质的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 4 Effects of QYS on monoamine neurotransmitters in frontal cortex of CUMS rats ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	NE/ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$	DA/ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$	5-HT/ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$
正常	-	1521 ± 536	101 ± 82	1215 ± 478
模型	-	$938 \pm 651^{1)}$	$72 \pm 45^{1)}$	$842 \pm 396^{1)}$
氟西汀	2.5	$1495 \pm 579^{2)}$	$126 \pm 74^{2)}$	$1316 \pm 485^{2)}$
QYS	0.625	745 ± 411	63 ± 34	737 ± 390
	2.5	1404 ± 805	88 ± 76	995 ± 607
	10	$1604 \pm 649^{2)}$	57 ± 37	$1217 \pm 564^{2)}$

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

CUMS 抑郁动物模型是常用的研究抗抑郁药物的模型,模型动物会出现快感缺失,自主活动减少,易惊恐,学习记忆能力下降及被动回避障碍等一系列情绪改变^[10]。抑郁动物在悬尾和强迫游泳实验中的行为绝望主要表现为不动时间增多,而抗抑郁药能够减少抑郁大鼠的不动时间^[11]。本研究中 QYS(0.625,2.5,10 mg·kg⁻¹) 在悬尾实验和强迫游泳实验中的剂量越大效应越强,具有一定的量效关系曲线,QYS 10 mg·kg⁻¹ 效果最好。

旷场实验在神经精神药物研究中用于观察动物的自主活动情况,兴奋药咖啡因可使小鼠的自主活动显著增多,而镇静药则显著减少小鼠自主活动中的运动总时间^[12]。本实验中,抗抑郁药氟西汀显著增加大鼠自主活动,具有一定的中枢兴奋作用,与其临床作用一致;在悬尾和强迫游泳实验中,氟西汀对大鼠不动时间的改善率超过 100%,提示除了抗抑郁作用外,还有中枢兴奋作用;QYS 对大鼠自主活动没有影响,进一步证明在悬尾实验和强迫游泳实验中 QYS 缩短大鼠不动时间的作用主要是其抗抑郁效应。

脑内单胺递质水平过低是抑郁症最重要的病因之一。临床上,选择性的 NE 再摄取抑制剂和 5-HT 再摄取抑制剂就是通过升高脑内单胺递质水平发挥抗抑郁作用^[13]。抑郁症患者中枢神经系统的前额叶皮质、海马、基底节等部位容易受损^[14],其中前额叶皮质和积极或消极情感及认知功能密切相关,是情绪中枢的重要组成部分^[15]。氟西汀能显著增加 CUMS 抑郁大鼠额叶皮层的 DA 和 5-HT 的水平^[16]。本研究显示 QYS 能够增加 CUMS 大鼠脑内额叶皮层 NE 和 5-HT 的水平,这可能是其发挥抗抑郁活性的作用机制之一。

[参考文献]

[1] 池名,青雪梅,潘彦舒,等. 120 例抑郁症患者打包多神经递质变化初探[J]. 中国中药杂志,2014,39(8): 1516-1524.
[2] Li X, Yang Q, Hu Y. Regulation of the expression of GABAA receptor subunits by an antiepileptic drug QYS [J]. Neurosci Lett, 2006,392(1/2):145-149.
[3] Kuang P G, Lang S Y, Zhang F Y, et al. Studies on qingyangshen (root of *Cynanchum otophyllum*). II. Effect of qingyangshen on metabolism of central

monoamines[J]. J Tradit Chin Med, 1985, 5(3):191-194.
[4] Kanner A M. Depression and epilepsy: A bidirectional relation? [J]. Epilepsia,2011,52(1):21-27.
[5] 李婧,孙建栋,刘岩,等. 米非司酮对抑郁型大鼠学习记忆能力的干预作用[J]. 药学报,2013,48(8): 1221-1226.
[6] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. Psychopharmacology (Berl), 1985,85(3):367-370.
[7] Porsolt R D, Bertin A, Blavet N, et al. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity [J]. Eur J Pharmacol, 1979, 57(2/3): 201-210.
[8] Katz R J, Roth K A, Carroll B J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1981, 5(2):247-251.
[9] 张林魁,钮心懿. 五味子醇甲对中枢神经系统单胺类递质的影响[J]. 中国医学科学院学报,1991,13(1):13-16.
[10] Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS [J]. Neuropsychobiology, 2005, 52(2):90-110.
[11] Bhattamisra S K, Khanna V K, Agrawal A K, et al. Antidepressant activity of standardised extract of *Marsilea minuta* Linn [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 117(1):51-57.
[12] 买文丽,王琼,刘新民,等. 小鼠自主活动实验中的评价指标 [J]. 中国实验动物学报,2008,16(3): 172-175.
[13] Millan M J. The role of monoamines in the actions of established and 'novel' antidepressant agents: a critical review [J]. Eur J Pharmacol, 2004, 500(1/3): 371-384.
[14] Maletic V, Robinson M, Oakes T, et al. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings [J]. Int J Clin Pract, 2007, 61(12):2030-2040.
[15] 王一牛,罗跃嘉. 前额叶皮质损伤患者的情绪异常 [J]. 心理科学进展,2004,12(2):161-167.
[16] 唐亚梅,陈春梅,刘勇. CUMS 抑郁模型大鼠脑组织 DA,5-HT 及其代谢产物的浓度变化 [J]. 湖南师范大学学报:医学版,2012,9(3):57-60.

[责任编辑 周冰冰]