

## 哈蟆油石油醚提取物的抗抑郁作用

游杰舒<sup>1</sup>, 石晋丽<sup>1\*</sup>, 张硕峰<sup>1</sup>, 段慧慧<sup>1</sup>, 史淑宁<sup>1</sup>, 郭建友<sup>2</sup>

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;

2. 中国科学院心理健康重点实验室, 中国科学院心理研究所, 北京 100101)

**[摘要]** **目的:**探索哈蟆油石油醚部位(ROS)的抗抑郁作用及可能的机制。**方法:**雄性 ICR 小鼠,分为 2 批,每批均设空白对照组(生理盐水)和 6 个治疗组(分别给予阳性药氟西汀 10 mg·kg<sup>-1</sup>和 ROS 不同剂量 10, 30, 100, 300, 900 mg·kg<sup>-1</sup>),连续灌胃给药 8 d。第 1 批动物在第 7 天给药后 1 h 和第 8 天给药后 1 h,分别采用小鼠强迫游泳和小鼠悬尾 2 种“行为绝望”抑郁动物模型进行行为学观察;行为学观察结束后小鼠眼球取血,用放射免疫法检测小鼠血清皮质酮(CORT)水平。第 2 批动物在第 8 天给药后采用利血平拮抗模型,观察 ROS 对由利血平引起小鼠体温下降和运动不能的影响。**结果:**ROS 100, 300, 900 mg·kg<sup>-1</sup>均能不同程度地缩短小鼠强迫游泳和悬尾不动时间( $P < 0.05$ ),能拮抗利血平致小鼠体温下降和运动不能( $P < 0.05$ ),降低小鼠血清皮质酮水平( $P < 0.05$ )。**结论:**ROS 具有抗抑郁作用,其机制可能与单胺类神经递质以及下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴密切相关。

**[关键词]** 哈蟆油; 石油醚部位; 抗抑郁; 强迫游泳; 悬尾; 单胺类递质; HPA 轴

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0271-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013170271

## Antidepressant Effects of Petroleum Ether Extracts from Ranae Oviductus

YOU Jie-shu<sup>1</sup>, SHI Jin-li<sup>1\*</sup>, ZHANG Shuo-feng<sup>1</sup>, DUAN Hui-hui<sup>1</sup>, SHI Shu-ning<sup>1</sup>, GUO Jian-you<sup>2</sup>

(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 antidepressant effects of petroleum ether extracts from Ranae Oviductus (ROS) and to investigate the related mechanisms. **Method:** Male ICR mice were divided into 2 batches, and every batch was randomly divided into control and six treatment groups. The control group was given normal saline and treatment groups were received ROS at dose of 10, 30, 100, 300, 900 mg·kg<sup>-1</sup> respectively for 8 days. In the first batch, 1 h after the 7 th day and 8 th day administration, forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST) were conducted for evaluation of behavior. And then the levels of serum corticosterone in the mice were measured by radioimmunoassay method. In the second batch, we observed the effects of ROS on depressive mice through reserpine reversal test after the day of 8 administration. **Result:** The group of 100, 300, 900 mg·kg<sup>-1</sup> ROS could significantly shorten mice immobility time in FST and TST ( $P < 0.05$ ), and could remarkably inhibit the decrease of body temperature and motor deficits in reserpine-induced hypothermia and motor deficits test at 4th hour ( $P < 0.05$ ). Moreover, the groups of 100, 300, 900 mg·kg<sup>-1</sup> ROS could decrease the cortisol level in mice serum compared with control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Petroleum ether extracts from Ranae Oviductus possess antidepressant effects, and it may be related to monoamine neurotransmitters and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis.

**[收稿日期]** 20121023(014)

**[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)

**[第一作者]** 游杰舒,在读硕士研究生,从事中药抗抑郁药药效学研究,Tel:010-84738623,E-mail:youyaling@163.com

**[通讯作者]** \*石晋丽,博士,教授,从事中药药效物质基础与新药源的寻找与开发研究,Tel:010-84738623,E-mail:shijl@vip.sina.com

[ **Key words** ] Ranae Oviductus; petroleum ether extracts; antidepressant effects; forced swimming test; tail suspension test; monoamine neurotransmitters; hypothalamic-pituitary-adrenal axis

抑郁症是一种常见的精神疾病,患者常表现出情绪低落、消极、悲观、内疚、注意力不集中、对事物失去兴趣、睡眠和饮食障碍等特点,严重者甚至产生自杀的想法<sup>[1]</sup>。随着生活节奏的加快,抑郁症患病率逐渐增加,给家庭和社会带来了严重的负担。世界卫生组织(WHO)预计,2020年,抑郁症将成为全球第二大疾病<sup>[2]</sup>。目前,现代医学治疗抑郁症的主要药物是西药,但其副作用大,药价高,易产生药物依赖性,对抑郁症这一多因素致病的复杂性疾病在治疗上还存在欠缺<sup>[3]</sup>。因此,寻求疗效高、副作用小的天然抗抑郁药已成为研究的热点。

蛤蟆油为蛙科动物中国林蛙雌蛙的输卵管,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,用于病后体弱,神疲乏力,心悸失眠,盗汗,劳嗽咳血,收载于《中国药典》(2010年版)。现代研究表明,蛤蟆油中的主要成分为蛋白质及氨基酸、脂肪酸(饱和与不饱和)、甾体激素、无机元素、维生素类等。有学者研究发现,蛤蟆油(RO)石油醚部位含有大量的不饱和脂肪酸,如亚油酸、花生四烯酸等<sup>[4]</sup>。近年的研究表明,多不饱和脂肪酸对于抑郁症有较好的治疗作用<sup>[5-7]</sup>,因此推测蛤蟆油中石油醚部位可能有较好的抗抑郁效应。本文旨在通过多种抑郁动物<sup>[8]</sup>模型,探索和评价蛤蟆油石油醚提取物抗抑郁作用的最佳剂量及其可能机制,为进一步的药效学研究和深入的机制探讨奠定基础。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 蛤蟆油(RO),购于中国药材公司,经北京中医药大学石晋丽教授鉴定动物来源为蛙科动物中国林蛙 *Rana temporaria chensinensis* David 雌蛙的输卵管,符合 2010 年版《中国药典》有关蛤蟆油药材项下的规定,批号 20120317;盐酸氟西汀(Fluoxetine,礼来苏州制药有限公司,批号 A333341,用生理盐水配成  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,给药容量  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,新鲜配制);利血平注射液(广东邦民制药有限公司,批号 101217);石油醚(北京化工厂);血清皮质酮(CORT)放免试剂盒(购自北京华英生物技术研究所,批号 20120416)。

**1.2 动物** ICR 小鼠,雄性,18~20 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号 SCXK(京)2007-0001。实验前在实验室饲养 1 周,

适应环境。室温( $22 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 65%~70%。日光照 12 h,自由饮食、摄水。

**1.3 仪器** KQ-500DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),MC-246 电子体温计[欧姆龙(大连)有限公司],MK-ANIMEX 型小鼠自主活动测试仪,(Muromachikikai CO., LTD. Tokyo), $\gamma$ -911 型全自动放免计数仪(中国科技大学实业总公司)。

## 2 方法

**2.1 蛤蟆油石油醚部位(ROS)的提取** 200 g RO,经粉碎后过 60 目筛,放入 1 000 mL 三角瓶中,加入 8 倍石油醚,超声 3 次,过滤,合并滤液,浓缩干燥得 ROS 4.55 g,得率为 2.3%,备用。

### 2.2 行为学实验

**2.2.1 小鼠自主活动实验** 小鼠 70 只,按体重随机分为 7 组,分别为正常对照组(生理盐水),氟西汀组( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),ROS(10,30,100,300,900  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组),每组 10 只,ig 给药,连续 7 d,并于第 7 天给药后 1 h,将实验小鼠放入自主活动记录仪中,适应 5 min 后,观察记录小鼠 5 min 内的活动次数。

**2.2.2 小鼠强迫游泳实验(FST)<sup>[9]</sup>** 小鼠于实验前 1 天进行 6 min 游泳适应。正式实验将小鼠置于水深 30 cm,水温( $25 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 的透明圆柱形游泳筒中,观察 6 min,记录后 4 min 内的不动时间。

**2.2.3 小鼠悬尾实验(TST)<sup>[10-11]</sup>** 第 8 天给药后 1 h 将小鼠尾部 1~2 cm 处部分贴在一水平木棍上,使动物成倒挂状态,其头部离台面约 20 cm,悬挂两侧用板隔开动物视线。观察 6 min,并记录后 4 min 内小鼠的不动时间。

**2.3 样本采集及血清 CORT 的检测** 行为学测试结束后,小鼠眼球取血,低温下  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,取血清,严格按照试剂盒说明书测 CORT。

**2.4 利血平拮抗实验<sup>[12]</sup>** 分组和给药方法同

**2.2.1**。于第 8 天给药 1 h 后,利血平  $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip,1 h 后将动物放在直径 7.5 cm 的圆形白纸中央,观察 15 s,比较各组小鼠仍然呆在圈内的个数。4 h 后将电子温度计探头轻轻插入动物肛门 1~2 cm 处,测定动物体温,比较各组体温。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 Welch 近似方差分析,率的比较采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对小鼠自主活动的影响** 与正常对照组比较,ROS组小鼠自主活动次数无差异。由此可以判断药物的抗抑郁作用并不是由于小鼠自主活动增强而引起的,见表1。

表1 ROS对小鼠自主活动的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	活动数/次
正常对照	-	593.90 ± 8.44
ROS	10	582.00 ± 17.36
	30	579.50 ± 9.19
	100	591.70 ± 12.06
	300	586.90 ± 11.33
	900	582.70 ± 8.91
氟西汀	10	609.60 ± 12.27 <sup>1)</sup>

注:与正常对照组比较<sup>1)</sup>P < 0.01(表2~4同)。

**3.2 对小鼠强迫游泳实验不动时间的影响** 与正常对照组比较,氟西汀和ROS 100 mg·kg<sup>-1</sup>能显著缩短强迫游泳实验中小鼠的不动时间(P < 0.01),其他剂量组有减少不动时间的趋势,见表2。

表2 ROS对小鼠强迫游泳不动时间的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	不动时间/s
正常对照	-	90.20 ± 18.62
ROS	10	65.82 ± 5.48
	30	63.67 ± 7.04
	100	59.25 ± 10.20 <sup>1)</sup>
	300	67.33 ± 9.53
	900	67.58 ± 10.07
氟西汀	10	52.33 ± 8.09 <sup>1)</sup>

**3.3 对小鼠悬尾实验不动时间的影响** 与正常对照组比较,氟西汀和ROS 100,300,900 mg·kg<sup>-1</sup>均能显著缩短小鼠不动时间(P < 0.01 或 P < 0.05),ROS 100 mg·kg<sup>-1</sup>时效果最明显,见表3。

表3 ROS对小鼠悬尾不动时间的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	不动时间/s
正常对照	-	91.58 ± 9.81
ROS	10	63.20 ± 8.14
	30	64.36 ± 14.46
	100	52.73 ± 9.79 <sup>1)</sup>
	300	57.90 ± 7.54 <sup>1)</sup>
	900	60.80 ± 13.37 <sup>1)</sup>
氟西汀	10	56.42 ± 11.15 <sup>1)</sup>

**3.4 对小鼠血清CORT的影响** 与正常对照组比

较,氟西汀和ROS 100,300,900 mg·kg<sup>-1</sup>组均能显著降低小鼠血清CORT水平(P < 0.05),见表4。

表4 ROS对小鼠血清皮质酮的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	CORT/μg·L <sup>-1</sup>
正常对照	-	273.57 ± 7.86
ROS	10	259.88 ± 13.43
	30	258.23 ± 7.95
	100	248.75 ± 4.80 <sup>1)</sup>
	300	248.98 ± 4.08 <sup>1)</sup>
	900	250.17 ± 3.86 <sup>1)</sup>
氟西汀	10	245.70 ± 10.49 <sup>1)</sup>

**3.5 对利血平拮抗小鼠模型的影响** 与模型组比较,氟西汀和ROS 100,300,900 mg·kg<sup>-1</sup>均能显著改善利血平诱导的体温下降(P < 0.01),对利血平诱导的运动不能也有一定的拮抗作用,并呈现出一定的剂量依赖性,见表5。

表5 ROS对利血平拮抗小鼠模型体温和运动不能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	体温/°C	运动不能/只(%)
模型对照	-	34.43 ± 0.21	10(100)
ROS	10	34.43 ± 0.14	8(80)
	30	34.94 ± 0.07	8(80)
	100	36.56 ± 0.19 <sup>2)</sup>	3(30) <sup>1)</sup>
	300	36.25 ± 0.38 <sup>2)</sup>	3(30) <sup>1)</sup>
	900	36.07 ± 0.20 <sup>2)</sup>	4(40) <sup>1)</sup>
氟西汀	10	37.05 ± 0.11 <sup>2)</sup>	2(20) <sup>1)</sup>

注:与模型对照组比较<sup>1)</sup>P < 0.05,<sup>2)</sup>P < 0.01。

### 4 讨论

小鼠强迫游泳和悬尾实验可使动物处于类似于抑郁症的绝望状态,且操作简单,快速,特异性高,是经典的抗抑郁药物筛选评价模型,不动时间能用来反映动物的“绝望行为和扭曲”或“对强压环境适应的失败”<sup>[13-14]</sup>。本实验通过小鼠悬尾实验和强迫游泳实验发现,ROS在100,300,900 mg·kg<sup>-1</sup>能明显减少小鼠的不动时间,说明ROS在这2个模型都显示出明确的抗抑郁作用,这也与其降低CORT水平程度相一致。ROS 100 mg·kg<sup>-1</sup>抗抑郁作用最为明显。在行为绝望模型中,一些精神兴奋性药物也能明显减少动物的不动时间,为了排除假阳性结果,我们对小鼠自主活动进行了观察,结果表明,实验各组对小鼠的自主活动均无影响,说明ROS无中枢兴奋性作用。

近年来,大量研究表明由肾虚引起的抑郁症可能与单胺类假说和下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴假

说有关<sup>[15-17]</sup>,其中单胺类假说被大部分学者所接受。利血平是一种囊泡再摄取抑制剂,它不可逆损毁囊泡膜功能,使囊泡外的递质易被单胺氧化酶降解,从而使神经递质肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺(NE,DA,5-HT)耗竭<sup>[18]</sup>。HPA轴系统是神经内分泌系统的一个重要分支,在应激状态时促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)分泌增多,进而影响促肾上腺皮质激素(ACTH)的分泌,后者又能引起CORT分泌增加,使HPA轴过度活化<sup>[19-20]</sup>;而CORT水平的升高还可造成海马齿状回部神经元损伤<sup>[21]</sup>,诱发5-HT,NE神经元功能障碍,引起中枢单胺递质紊乱,最终引发或加重抑郁症<sup>[22]</sup>。作者在本研究中探讨了ROS对利血平诱导的抑郁症的影响,结果显示ROS能显著改善经利血平诱导的小鼠体温下降和运动不能,降低血清CORT水平,这提示ROS的抗抑郁作用可能是通过调节单胺类递质以及HPA轴功能来实现的。

综上,ROS在行为绝望模型和利血平拮抗模型中均显示一定的抗抑郁作用,这为进一步药效学和机制研究奠定了基础。但实验中还存在许多问题有待于深入探讨,我们将在下一步大鼠实验中采用肾阴虚抑郁模型进行研究,检测与抗抑郁作用机制相关的更多指标,并进一步寻找ROS中具有抗抑郁活性的化合物。

#### [参考文献]

[1] 郭雨欣,邢国刚. 抑郁症的生物学机制研究进展[J]. 中国神经精神病杂志,2012,38(1):57.

[2] Murray C J, Lopez A D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors; Global Burden of Disease Study [J]. The Lancet, 1997, 349(9063):1436.

[3] 吴琨,时京珍,曲莉,等. 交泰丸抗抑郁作用的药理实验研究[J]. 贵阳中医学院学报,2009,31(5):30.

[4] 王永生. 哈蟆油药效成分及其质量控制方法的研究[D]. 吉林:吉林大学,2007:5.

[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.

[6] 李成义,金子,王琳. GC/MS分析吉林产哈士蟆卵油的脂肪酸[J]. 中国药理学杂志,1994,29(1):18.

[7] 郭晓云.  $\omega$ -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,2007:2.

[8] Treit D, Engin E, McEown K. Animal models of anxiety and anxiolytic drugaction [J]. Curr Top Behav Neurosci, 2010, 2(1):121.

[9] Detke M J, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the

rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants [J]. Psychopharmacology, 1995, 121(1):66.

[10] Porsolt R D, Anton G, Blavet N, et al. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments [J]. Eur J Pharmacol, 1978, 47(4):379.

[11] 高杉,李苒. 抑郁症动物模型及其评价标准研究进展[J]. 天津中医药大学学报,2012,31(1):57.

[12] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1998:1061.

[13] Wang W X, Hu X Y, Zhao Z Y, et al. Antidepressant-like effects of liquiritin and isoliquiritin from Glycyrrhiza uralensis in the forced swimming test and tail suspension test in mice [J]. Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry, 2008, 32(5):1179.

[14] 武姣姣,石晋丽,唐民科,等. 甘松对动物行为绝望模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):205.

[15] 朱学莉,林昱,杨来启,等. 芪参复康胶囊对抑郁模型大鼠HPA轴功能的影响[J]. 陕西中医,2011,32(4):493.

[16] Mitchell A J. The role of corticotropin releasing factor in depressive illness: a critical review [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1998, 22(5):635.

[17] 陈晓阳,李晟,邹志,等. 忧虑康液对肾阴虚抑郁模型大鼠血浆促肾上腺皮质激素、皮质醇及下丘脑形态学的影响[J]. 中国老年学杂志,2010,30(4):1080.

[18] 王巍,赵德忠,孙晓芳,等. 首茸方对利血平小鼠脑内多巴胺及其代谢产物的影响[J]. 中国中药杂志,2002,27(5):368.

[19] Aihara M, Ida I, Yuuki N, et al. HPA axis dysfunction in unmedicated major depressive disorder and its normalization by pharmacotherapy correlates with alteration of neural activity in prefrontal cortex and limbic/paralimbic regions [J]. Psychiatry Res, 2007, 155(3):245.

[20] 徐永君,盛慧,倪鑫. 抑郁症发病机制研究进展[J]. 安徽医科大学学报,2012,47(3):323.

[21] Lijima M, Ito A, Kuros, et al. Pharmacological characterization of repeated corticosterone injection-induced depression model in rats [J]. Brain Res, 2010, 1359(1):75.

[22] Duval F, Mokrani M C, Monrea-Ortiz J A. Cortisol hypersecretion in unipolar major depression with melancholic and psychotic features: dopaminergic, noradrenergic and thyroid correlates [J]. Psychoneuroendocrinology, 2006, 31(7):876.

[责任编辑 李玉洁]