

佛手挥发油的抗抑郁作用机制探讨

高洪元*, 田青

(山东省泰安市中医二院, 山东 泰安 271000)

[摘要] **目的:** 在探讨佛手挥发油对慢性应激所致大鼠抑郁模型(CUMS)的干预作用。**方法:** 90 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组, 每组 15 只, 分别为空白对照组、模型组、阳性药组(10 mg·kg⁻¹ 氟西汀 ig 21 d)、佛手挥发油低、中、高剂量(150, 300, 600 mg·kg⁻¹ 佛手挥发油 ig 21 d)。除空白对照组外, 其余 5 组大鼠经历 21 d 慢性应激造成抑郁模型, 各组大鼠造模同时给予相应药物。21 d 慢性应激后以糖水偏爱和旷场测试测定动物的行为变化, 放免法测定大鼠血清中皮质酮(CORT)水平, 蛋白免疫印迹法测定脑组织神经营养因子(BDNF)的蛋白表达水平。**结果:** 与正常组大鼠比较, 模型组经过慢性应激 3 周后大鼠糖水偏好由(88.1 ± 13.3)% 降至(60.5 ± 9.8)%。旷场水平评分及垂直评分分别由(123.5 ± 21.3)和(38.2 ± 5.9)降为(72.5 ± 12.7)和(17.1 ± 5.1), 表明慢性应激导致大鼠产生抑郁样行为; 同时, 抑郁大鼠的血清 CORT 水平由(42.1 ± 7.7) μg·L⁻¹ 增加为(117.6 ± 19.3) μg·L⁻¹, 海马 BDNF 表达水平由(0.22 ± 0.04)降为(0.07 ± 0.02)。佛手挥发油干预治疗后能呈剂量依赖地改善由慢性应激所致的大鼠抑郁行为及生化指标改变。其中 300, 600 mg·kg⁻¹ 佛手挥发油组糖水偏好分别为(70.7 ± 10.2)% 和(77.1 ± 11.9)%, 与抑郁组比较有显著的统计学差异(分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$); 150, 300, 600 mg·kg⁻¹ 佛手挥发油组旷场水平评分分别为(87.7 ± 15.4), (98.3 ± 19.7), (110.3 ± 28.9), 与抑郁组比较有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$); 300, 600 mg·kg⁻¹ 佛手挥发油组旷场垂直评分分别为(24.5 ± 6.3), (29.2 ± 7.2), 与抑郁组比较有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$); 皮质酮浓度分别为(90.1 ± 13.5), (77.5 ± 10.7) μg·L⁻¹, 与抑郁组比较有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$); 300, 600 mg·kg⁻¹ 佛手挥发油组海马 BDNF 相对含量为(0.15 ± 0.03)和(0.18 ± 0.03), 与抑郁组比较有显著的统计学差异(分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。**结论:** 佛手挥发油的抗抑郁作用机制可能与调节血清 CORT 水平和海马组织 BDNF 表达水平有关。

[关键词] 抗抑郁; 脑源性神经营养因子; 慢性应激抑郁; 下丘脑-垂体-肾上腺轴; 佛手

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0231-04

Antidepressant Effect of Fingered Citron Volatile in Rats

GAO Hong-yuan*, TIAN Qing

(The Second Traditional Chinese Hospital of Tai'an, Tai'an 271000, China)

[Abstract] **Objective:** Previous studies have demonstrated that fingered citron volatile produced antidepressant-like action in various mouse models with behavioral despair. The present study aimed to examine whether fingered citron volatile could affect the chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced depression in rats. **Method:** Ninety male Wistar rats were randomly divided into six groups as follows: control, model, positive control (orally given fluoxetine 10 mg·kg⁻¹ for 21 days), low, middle and high dosages of fingered citron volatile (orally given 150, 300, 600 mg·kg⁻¹ of fingered citron volatile for 21 days). All groups except control were exposed to chronic stress for 21 days to establish depression model and every rat was given corresponding drugs simultaneously. After 21 days, the behavior changes were measured by sucrose preference and open-field, serum corticosterone level was measured by radio-immunity and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels was measured by Western-blot. **Result:** CUMS being lasted for 3 weeks, caused depression-like behavior in rats, as indicated by the significant decrease in sucrose preference (from 88.1% ± 13.3% to 60.5% ± 9.8%) and in open-field scores (from 123.5 ± 21.3 to 38.2 ± 5.9 and from 72.5 ± 12.7 to 17.1 ± 5.1, respectively). Whereas serum corticosterone level was significantly increased in rats exposed to CUMS [from (42.1 ± 7.7) μg·L⁻¹ to

[收稿日期] 20111013(021)

[通讯作者] * 高洪元, 主管技师, Tel: 0538-6262010, E-mail: gaohydoc@126.com

(117.6 ± 19.3) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$], and BDNF protein expression were decreased (from 0.22 ± 0.04 to 0.07 ± 0.02) in CUMS-treated rats. Daily intragastric administration of fingered citron volatile ($150, 300, 600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) during the three weeks of CUMS significantly suppressed behavioral and biochemical changes induced by CUMS. As the sucrose preferences in $300, 600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ fingered citron volatile were $70.7\% \pm 10.2\%$ and $77.1\% \pm 11.9\%$ ($P < 0.05$ and $P < 0.01$); the horizontal scores in $150, 300, 600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ fingered citron volatile were $87.7 \pm 15.4, 98.3 \pm 19.7$ and 110.3 ± 28.9 ($P < 0.05, P < 0.05$ and $P < 0.01$); the vertical scores in $300, 600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ fingered citron volatile were 24.5 ± 6.3 and 29.2 ± 7.2 ($P < 0.05$ and $P < 0.01$); the serum corticosterone levels in $300, 600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ fingered citron volatile were (90.1 ± 13.5) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and (77.5 ± 10.7) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$ and $P < 0.01$); the BDNF levels in $300, 600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ fingered citron volatile were 0.15 ± 0.03 and 0.18 ± 0.03 ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). **Conclusion:** The results suggest that the antidepressant-like actions of fingered citron volatile may be mediated by modulating the CORT concentration and increasing the expression of BDNF in hippocampus tissues.

[Key words] antidepressant; brain-derived neurotrophic factor; chronic unpredictable mild stress; hypothalamic-pituitary-adrenal axis; fingered citron

随着现代社会生活节奏的加快、竞争加剧和工作压力的加大,抑郁症的患病率呈逐年上升的趋势,已经成为危害现代人类健康的重要疾病之一,据世界卫生组织预测,到 2020 年抑郁症将成为仅次于心脏病的第二大疾病^[1]。在抗抑郁症药物开发方面,虽然西药呈现出良好的抗抑郁效应,但随之而来的毒副作用也一直是研究者所面临的最棘手的问题。国内外在抗抑郁药物的研制与开发方面逐渐重视传统药物和天然药物^[2]。

佛手又名佛手柑,为芸香科植物佛手的成熟果实。《金氏药帖》言其“专治气膈,解郁,大能宽胸”,为疏肝理气之佳品。佛手挥发油是佛手所含的主要有效成分,前期研究表明,佛手挥发油能降低小鼠在强迫游泳和悬尾试验中的不动时间,表现出抗抑郁作用^[3],但是具体的抗抑郁机制尚不明确。本实验将考察长期给予佛手提取物是否能够产生抗抑郁的作用,并通过测定血清中皮质酮水平以及海马脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)表达水平探讨其抗抑郁机制。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级 Wistar 大鼠,体重 $200 \sim 220 \text{ g}$,军事医学科学院动物中心,动物许可证号 SCXK(军)2007-004。

1.2 药物 佛手挥发油制备:成熟新鲜金华地产佛手果 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 购自金华九德堂药店,轧碎后加 2 倍纯净水,置于水蒸气蒸馏装置中,浸泡 1 h 加热蒸馏 2 h,即得无色透明、具有佛手香气的佛手挥发油,提取率为 $7.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。经毛细管气相色谱-质谱联用法(GC-MS)测定,佛手

挥发油的化学成分主要为 D-柠檬烯,其次为萜烯及环己二烯等。在实验前以无水乙醇:挥发油:蒸馏水:聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯(吐温 80)1.0:1.0:3.0:0.2 的比例配制成 $200 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 的佛手挥发油乳液。阳性对照药:氟西汀,为 Sigma 公司产品。

1.3 试剂 皮质酮(CORT)放免试剂盒购自北京华英生物技术公司;BDNF 抗体和 β -actin 抗体,美国 Santa Cruze 公司产品。

1.4 仪器 JY99-IIIB 型超声波细胞破碎仪,宁波新芝科器研究所;5415R 型高速离心机,德国 Eppendorf 公司;Lambdal P40 紫外-可见光分光光度计,美国 PE 公司;Mini-ROTEAN3 电泳系统与 Mini Trans-Blot 转移系统,美国 Bio-Rad 公司;TS-1 型脱色摇床,江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司;GC-911-放射免疫计数器,中国科技大学实业总公司。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 所有大鼠适应环境 1 周,90 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组,每组 15 只,分别为空白对照组、模型组、阳性药组、佛手挥发油低、中、高剂量。其中阳性药组给予氟西汀 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,佛手挥发油低、中、高剂量组分别 ig 给予佛手挥发油($150, 300, 600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续给药 21 d。正常组及模型组每日 ig 等剂量生理盐水。

动物造模:采用慢性轻度不可预见性的应激模型(chronic unpredicted mild stress, CUMS)。正常组每笼 5 只饲养,不给予任何刺激,其余各组均单笼饲养,参照应激程序制备慢性应激抑郁模型^[4]。具体如下:将倾斜鼠笼 24 h,明暗颠倒 24 h, $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰水游泳 5 min, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 热水游泳 30 min,夹尾 1 min,水平摇

晃 5 min,湿垫料 24 h,共 7 种刺激随机安排到 21 d 内,每日 1 种,每种刺激至少出现 2 次,同种刺激不能连续出现,使动物不能预料刺激的发生。连续给予 21 d 的应激,造成慢性应激抑郁模型。

2.2 糖水偏好测试 所有大鼠在实验前及开始造模后进行糖水偏好实验。动物在禁食禁水 20 h 后放入 1 瓶 1% 的蔗糖水和 1 瓶普通饮用水,观察其在 1 h 内的液体消耗量,计算糖水偏爱比率。

$$\text{糖水偏爱} = \frac{\text{糖水消耗}}{\text{总液体消耗}} \times 100\%$$

2.3 旷场测试 所有动物于 21 d 后 1~2 h,置于安静、黑暗的屋子里进行实验。水平运动得分:大鼠置于敞箱中央格,以穿越 1 格为 1 分(四爪均进入方格才计数);垂直运动得分:两前爪腾空或攀附墙壁次数。水平活动得分反映大鼠的运动活动性水平;垂直活动得分则反映其兴趣高低。

2.4 大鼠血标本的采集及 CORT 的测定 行为学测试结束后,断头处死大鼠取全血,4 ℃ 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清备测 CORT,严格按照北京华英生物技术公司提供的试剂盒说明书进行操作。

2.5 大鼠海马 BDNF 的测定 大鼠海马组织总蛋白提取按 Western 细胞裂解液说明书操作。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,加入 6 × 上样缓冲液,沸水浴变性 5 min, -70 ℃ 冻存备用。40 μg 组织总蛋白在 15% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离。而后,将凝胶半干式电转印至硝酸纤维素膜(NC 膜)。取出 NC 膜,浸于含 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲生理盐水(Tris buffered saline, TBS)中室温轻摇封闭 1 h,用含 0.05% 的聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯(吐温-20)的 TBS (TBST)缓冲液漂洗干净,浸入 TBST 稀释的一抗(兔抗鼠 BDNF 抗体 1:2 000;兔抗鼠 β-actin 抗体:1:1 000),4 ℃ 孵育 15 h。用 TBST 漂洗 NC 膜 3 次,在 TBST 稀释的 HRP 标记的二抗溶液(山羊抗兔 IgG 1:2 000)中室温孵浴 1 h。NC 膜用 TBST 缓冲液漂洗 2 次,再用 TBS 漂洗 1 次,用 ECL 检测试剂盒显色,曝光、显影和定影,胶片经柯达图像分析软件测定。以 BDNF 光度值除以 β-actin 光度值代表 BDNF 的相对表达水平。

2.6 统计学方法 采用 CHISS 统计软件进行运算,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间比较采用方差分析(ANAVO),组间比较采用均数两两比较(SNK 法), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠糖水偏好的变化 分别在应激第 1,21

天测定各组大鼠糖水偏好,此指标反映动物的奖赏反应程度。应激前各组大鼠糖水偏好无显著差异。长期慢性应激后,模型组大鼠糖水偏好比为 60.5% ± 9.8%,与模型对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$)。给予佛手提取液,在 300,600 mg·kg⁻¹ 剂量情况下,糖水偏好比分别为 70.7% ± 10.2% 和 77.1% ± 11.9%,与空白组相比,能显著提高应激所致的糖水偏好比($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。阳性对照组氟西汀也显著提高应激性大鼠的糖水偏好($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠糖水摄入变化比较($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	糖水偏好/%	
		第 1 天	第 21 天
空白	-	86.8 ± 14.7	88.1 ± 13.3
模型	-	86.3 ± 13.2	60.5 ± 9.8 ¹⁾
氟西汀	10	87.1 ± 11.6	78.3 ± 14.1 ³⁾
佛手挥发油	150	85.6 ± 10.2	64.3 ± 10.8
	300	86.9 ± 12.6	70.7 ± 10.2 ²⁾
	600	88.1 ± 13.5	77.1 ± 11.9 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 对大鼠旷场的影响 与对照组比较,长期慢性应激能显著降低大鼠的水平运动和垂直运动评分,差异有显著的统计学意义($P < 0.01$),提示抑郁模型建立的成功。佛手挥发油高、中剂量组均可明显增加大鼠水平和垂直运动得分($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。阳性对照组氟西汀也显著降低应激性大鼠的不动时间($P < 0.01$),见表 2。

表 2 各组大鼠旷场变化比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	评分/分	
		水平运动	垂直运动
空白	-	123.5 ± 21.3	38.2 ± 5.9
模型	-	72.5 ± 12.7 ¹⁾	17.1 ± 5.1 ¹⁾
氟西汀	10	110.1 ± 21.1 ³⁾	26.2 ± 5.5 ³⁾
佛手挥发油	150	87.7 ± 15.4 ²⁾	19.9 ± 4.1
	300	98.3 ± 19.7 ²⁾	24.5 ± 6.3 ²⁾
	600	110.3 ± 28.9 ³⁾	29.2 ± 7.2 ³⁾

3.3 对慢性应激抑郁模型大鼠血清 CORT 的影响 如表 3 所示,与对照组比较,慢性应激大鼠血清中 CORT 浓度显著增加($P < 0.01$)。而氟西汀组和佛手挥发油中、高剂量组 CORT 浓度均有一定程度的降低,并且与模型组比较具有显著差异($P < 0.01$,

$P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠皮质酮变化比较($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	皮质酮/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	42.1 ± 7.7
模型	-	117.6 ± 19.3 ¹⁾
氟西汀	10	72.3 ± 10.9 ³⁾
佛手挥发油	150	102.3 ± 18.3
	300	90.1 ± 13.5 ²⁾
	600	77.5 ± 10.7 ³⁾

3.4 对慢性应激抑郁模型大鼠海马 BDNF 的影响

如表 4 所示,与对照组比较,慢性应激大鼠海马 BDNF 表达显著下降($P < 0.01$)。而氟西汀组和佛手挥发油中、高剂量组 CORT 浓度均有一定程度的增加,并且与模型组比较具有显著差异($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠 BDNF 表达变化比较($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	相对表达量
空白	-	0.22 ± 0.04
模型	-	0.07 ± 0.02 ¹⁾
氟西汀	10	0.19 ± 0.03 ³⁾
佛手挥发油	150	0.12 ± 0.03
	300	0.15 ± 0.03 ²⁾
	600	0.18 ± 0.03 ³⁾

4 讨论

抑郁症是一类与应激密切相关的精神类疾病,应激性生活事件是导致抑郁症发生的一个重要因素。慢性应激模型模拟了抑郁症的环境诱因,模型动物的行为改变与内源性抑郁症症状相似^[5-6],是较为公认的抑郁模型之一。本结果显示,慢性应激后大鼠糖水偏爱明显下降,同时大鼠旷场水平运动和垂直运动评分下降,提示抑郁模型复制成功。慢性应激的同时每天灌胃给予佛手挥发油可对应激引起的上述改变,说明佛手具有抗抑郁活性。我们的研究同时表明,佛手挥发油对慢性应激性所致抑

郁行为的干预作用,主要与减弱抑郁模型大鼠 HPA 轴的亢进程度,上调长期慢性应激导致大鼠海马 BDNF 表达降低有关。

以往的研究表明佛手具有舒肝理气、宽胸化痰等功效,可用于支气管炎和哮喘的治疗。随着对佛手研究的深入,其抗抑郁作用也逐渐得到重视^[3,6]。本研究的结果表明,佛手挥发油的抗抑郁作用呈现明显的剂量依赖关系。300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量佛手挥发油给药即能产生明显的抗抑郁作用,600 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量佛手挥发油与经典抗抑郁药氟西汀 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 效果相当,提示佛手挥发油有较强的抗抑郁作用和较好的开发前景。

本研究还存在着一些不足:没有检测脑组织其他部位如皮层的 BDNF 变化,也没有检测相关神经递质的变化。今后需要从多方面进行探索,以阐明佛手挥发油治疗抑郁症的机制。

[参考文献]

- [1] 马荣,钱瑞琴,姚海燕,等. 解郁丸抗抑郁作用机制的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10):168.
- [2] 官涛,黄学宽,陈笛,等. 开心解郁汤对抑郁模型大鼠脑内单胺类神经递质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):221.
- [3] 芦红,吴月霞,杨丽嘉,等. 川佛手提取物对小鼠的抗抑郁作用[J]. 郑州大学学报:医学版,2011, 46(2):220.
- [4] 刘丽琴,罗艳,张瑞睿,等. 人参皂苷对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及 HPA 轴、BDNF 的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10):1342.
- [5] Vollmayr B, Henn F A. Stressmodels of depression[J]. Clin Neurosci Res, 2003, 3(4/5):245.
- [6] Li Y F, Luo Z P. Progress on the mechanism study of stress induced depression[J]. Prog Physiol Sci, 2002, 15(2):142.

[责任编辑 聂淑琴]