

白芍提取物对嗅球损毁抑郁模型大鼠
行为学及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响

王景霞, 张建军*, 苗春平, 刘妍, 林清, 陈振振
(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:研究白芍提取物对嗅球损毁抑郁模型大鼠行为学及下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的影响。方法:将嗅球损毁大鼠随机分为对照组、模型组、阳性药氟西汀 2.5 mg·kg⁻¹组以及白芍提取物 70,35,17.5 mg·kg⁻¹组,采用敞箱法、跳台法观察嗅球损毁大鼠的行为变化,同时用放免法分析白芍提取物对嗅球损毁大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放素(CRH)、垂体促肾上腺皮质激素(ACTH)和血清皮质酮(CORT)含量的影响。结果:大鼠嗅球损毁后敞箱行为出现明显变化,水平运动和垂直运动显著增加,白芍提取物中、高剂量组可显著降低大鼠水平运动和垂直运动的得分;跳台试验中,造模后大鼠训练期和测试期的错误次数显著增加,白芍提取物中、高剂量组能显著降低嗅球损毁大鼠训练期和测试期的触电次数;嗅球损毁大鼠下丘脑 CRH,垂体 ACTH,血清 CORT 含量明显增加,白芍提取物中、高剂量组能显著降低嗅球损毁大鼠 CRH,ACTH,CORT 的含量。结论:白芍提取物能明显改善嗅球损毁大鼠的行为活动,并且对嗅球损毁大鼠亢进的 HPA 轴功能的调整作用是白芍提取物治疗抑郁症的机制之一。

[关键词] 白芍;嗅球损毁;促肾上腺皮质激素释放素;促肾上腺皮质激素;皮质酮

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0155-04

Influences of Extract of Peony Radix Alba on Behavior
and Hypothalamic-pituitary-adrenocortical Axis in Depressive
Rats Model with Damaged Olfactory Bulb

[收稿日期] 20100714(003)

[第一作者] 王景霞, 医学博士, 副教授, 研究方向: 疑难疾病防治的中药用药规律, Tel: 010-64287006, E-mail: wjx117@sohu.com

[通讯作者] * 张建军, 医学博士, 副研究员, 研究方向: 疑难疾病防治的中药用药规律, Tel: 010-64286993, E-mail: zjj59@163.com

生抗痴呆作用机制之一;本实验结果从形态学角度为灵芝多糖的临床应用提供一定的理论依据。

[参考文献]

[1] 姚柏春, 邓兆宏, 孙天敏, 等. Aβ₁₋₄₀ 诱导大鼠海马突触体素和突触数量的变化[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(2): 153.

[2] 刘薇. 医学体视学在小儿神经疾病研究中的应用[J]. 脑与神经疾病杂志, 2003, 11(3): 192.

[3] 杨春. 突触素的若干研究[J]. 河南医学研究, 2004, 13(1): 85.

[4] 王怀星, 姚志彬, 顾耀铭, 等. 老年性记忆减退大鼠内侧隔核突触结构的改变[J]. 神经解剖学杂志, 2000, 16(1): 40.

[5] 郑富胜. 细胞形态立体计量学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1990: 36.

[6] 张跃平, 袁华, 黎莉, 等. 灵芝多糖对 AD 模型大鼠海马组织 Caspase-3 和 FasL 表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2008, 17(5): 484.

[7] Bouren J N, Harris K M. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines[J]. Annu Rev Neurosci, 2008, 31: 47.

[8] 安思训. 大鼠学习记忆时 CA3 区突触素免疫阳性产物的变化及突触出芽表达[J]. 中国老年学杂志, 2005, 12(25): 1511.

[9] 宿宝贵, 潘三强, 韩辉, 等. 大鼠海马结构在空间辨别性学习记忆时突触素表达的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2000(5): 421.

[10] Remondes M, Schuman E M. Molecular mechanisms contributing to long-lasting synaptic plasticity at the temporoammonic-CA1 synapse[J]. Learn Mem, 2003, 10(4): 247.

[责任编辑 聂淑琴]

WANG Jing-xia, ZHANG Jian-jun^{*}, MIAO Chun-ping, LIU Yan, LIN Qing, CHEN Zhen-zhen
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influences of extract from Peony Radix Alba on the behavioral and hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis changes in rats with damaged olfactory bulb (DOB). **Method:** The tests of open-field and step-down passive avoidance were used to observe the behaviors of rats. Radioimmunoassay (RIA) was used to analyze the level of corticotropin releasing hormone (CRH) in hypothalamus, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in pituitary gland and cortisol (CORT) in serum of rats with DOB. **Result:** The rats had a characteristic hyperactivity in the test of “open-field” and learning deficits in step-down passive avoidance ($P < 0.05$), and their levels of CRH, ACTH and CORT increased significantly ($P < 0.05$). The extract of Peony Radix Alba at the dose of 70, 35 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ corrected the behavioral changes ($P < 0.05$) and decreased the levels of CRH, ACTH and CORT ($P < 0.05$). **Conclusion:** The extract of Peony Radix Alba can correct behavioral changes in rats with DOB, and its regulating effect on HPA axis is one of the mechanisms for treating depression.

[Key words] Peony Radix Alba; damaged olfactory bulb; corticotropin releasing hormone; adrenocorticotrophic hormone; cortisol

白芍味苦、酸,性微寒,归肝、脾经,功能养肝血、补肝阴、抑肝阳,为养血柔肝,促进肝主疏泄,维持正常情志活动的要药。四逆散、枳实芍药散、柴胡疏肝散、逍遥散等历代疏肝解郁的名方中,皆以白芍为主药;现代中医临床治疗抑郁症的方药,无论在组方频次和用药剂量上,白芍都占有重要的位置。近年来研究显示,芍药水煎剂有抗抑郁作用^[1],芍药苷也具有抗抑郁作用^[2]。但是目前对其治疗抑郁症的物质基础、药理机制等方面的研究还不是十分的全面和深入。作者在前期研究中发现,采用乙醇提取、大孔树脂精制的方法制备的白芍提取物(含 48.89% 芍药苷和 18.99% 芍药内酯苷),在多个小鼠模型中显示具有抗抑郁作用^[3],所以本研究选用大鼠嗅球损毁抑郁模型,进一步观察白芍提取物的抗抑郁作用,并通过观察其对下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的影响探讨可能的抗抑郁机制。

1 材料

1.1 药物 受试药物:白芍提取物(含 48.89% 芍药苷和 18.99% 芍药内酯苷),由北京欧纳尔生物工程有限公司提供,批号 20080915;阳性药盐酸氟西汀(Fluoxetine, Prozac 百忧解),礼来苏州制药有限公司,批号 A333341。

1.2 动物 SD 雄性大鼠,体重 220 ~240 g,由北京维通利华公司提供,合格证号 SCXK(京)2007-0001。

所有动物提前 1 周购入,常规饲养。

1.3 仪器与试剂 γ911 全自动放免计数仪(中国科技大学实业总公司生产)。促肾上腺皮质激素释放素(CRH)放免试剂盒,批号 20081130,血清皮质酮(CORT)放免试剂盒,批号 20081127,促肾上腺皮质激素(ACTH)放免试剂盒,批号 20081129 均购自北京华英生物技术研究所以。

2 方法

2.1 分组和给药 正常大鼠根据体重随机分成假手术组、模型组、阳性药盐酸氟西汀组($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、白芍提取物高($70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、白芍提取物中($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、白芍提取物低($17.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)剂量组。采用 ig 给药,每日 1 次,连续给药 21 d。各组均按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药,每周称 1 次体重。空白组给予去离子水。

2.2 造模^[4] 大鼠用水合氯醛麻醉后,从大鼠前囟前 1 cm 至前囟后 1 cm 正中线处切开,暴露颅骨,在距离前囟前面 8 mm、正中线两侧 2 mm 处分别钻两个 2 mm 直径的小孔,将 HS80 型电烙铁的烙尖垂直插入颅内,破坏嗅球。假手术组操作同造模组,但不损毁嗅球。

2.3 行为学观察

2.3.1 敞箱试验(open-field)^[4] 敞箱高 40 cm,长和宽均为 80 cm,无盖,周壁和箱底均为黑色,底面划分为面积相等的 25 块方格。以动物穿越方格数作

为水平活动得分,以直立次数为垂直活动得分(两前肢离地 1 cm 以上)。每只动物进行 1 次测定,每次 3 min。

2.3.2 跳台试验^[4] 实验装置为一个 30 cm ×30 cm ×30 cm 的有机玻璃箱,底面是铜栅,间距为 0.8 cm,可以通电,电压由一变压器控制。箱子左后角置一高 5 cm 直径为 8 cm 的木头平台。将动物放入反应箱内适应环境 3 min,然后立即通 36 V 交流电,动物受到电击,正常反应是跳上平台以躲避伤害性刺激。多数动物可能会再次或多次跳至铜栅上,受到电击后又迅速跳回平台,如此训练 5 min,大鼠受到电击的次数为错误次数。24 h 后重做测验,将大鼠置于平台上,通电并记时,记录 5 min 内的错误次数。

2.4 样品制备及检测方法 行为学实验结束后,所有动物断头取血后,迅速在冰上取下丘脑、垂体、称重后置组织冷冻管中用液氮快速冷冻后,放入 - 70 °C 冰箱保存至测定。用放免法测试 CRH, ACTH, CORT 指标。

2.5 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,运用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行各组间比较,显著性水平以 $P < 0.05$ 为标准。

3 结果

3.1 白芍提取物对嗅球损毁大鼠敞箱活动的影响 结果表明,与伪手术组相比模型组大鼠水平运动得分、垂直运动得分显著升高($P < 0.05$),与模型组相比白芍提取物中、高剂量组和阳性药盐酸氟西汀组的大鼠水平运动、垂直运动得分显著降低($P < 0.05$),见表 1。

表 1 白芍提取物对嗅球损毁大鼠敞箱活动的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	垂直运动得分	水平运动得分
伪手术	-	9.00 ±3.74 ¹⁾	26.82 ±8.82 ¹⁾
模型	-	12.81 ±5.00	43.00 ±16.55
氟西汀	2.5	9.20 ±2.10 ¹⁾	27.00 ±7.02 ¹⁾
白芍提取物	17.5	12.45 ±3.91	40.36 ±11.87
	35	9.36 ±1.91 ¹⁾	26.64 ±7.31 ¹⁾
	70	9.45 ±3.53 ¹⁾	27.09 ±10.23 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 ~3 同)。

3.2 白芍提取物对嗅球损毁大鼠跳台错误次数的影响 结果表明,与伪手术组相比模型组大鼠训练

期错误次数和测试期错误次数显著增加($P < 0.05$),与模型组相比,白芍提取物中、高剂量组及盐酸氟西汀组的大鼠训练期错误次数和测试期错误次数显著降低($P < 0.05$),见表 2。

表 2 白芍提取物对嗅球损毁大鼠跳台错误次数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	训练期错误次数	测试期错误次数
伪手术	-	1.55 ±1.75 ¹⁾	1.27 ±1.27 ¹⁾
模型	-	3.18 ±1.83	2.72 ±1.79
氟西汀	2.5	1.60 ±1.17 ¹⁾	1.50 ±1.26 ¹⁾
白芍提取物	17.5	2.36 ±1.36	2.18 ±1.33
	35	1.55 ±1.69 ¹⁾	1.45 ±1.36 ¹⁾
	70	1.73 ±1.74 ¹⁾	1.45 ±0.82 ¹⁾

3.3 白芍提取物对嗅球损毁大鼠 HPA 轴的影响 结果表明,与伪手术组相比模型组大鼠下丘脑 CRH,垂体 ACTH,血清 CORT 均明显增加($P < 0.05$),与模型组相比白芍提取物中、高剂量组和阳性药盐酸氟西汀组能明显降低嗅球损毁大鼠下丘脑 CRH,垂体 ACTH,血清 CORT 的含量($P < 0.05$),见表 3。

表 3 白芍提取物对嗅球损毁大鼠 HPA 轴的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	CRH /ng·g ⁻¹	ACTH /ng·g ⁻¹	CORT /ng·L ⁻¹
伪手术组	-	5.16 ±1.24 ¹⁾	25.84 ±10.43 ¹⁾	356.82 ±57.46 ¹⁾
模型组	-	6.60 ±1.51	36.51 ±12.84	424.42 ±130.27
氟西汀	2.5	4.48 ±1.09 ¹⁾	23.04 ±8.68 ¹⁾	352.28 ±40.69 ¹⁾
白芍提取物	17.5	5.90 ±2.07	28.01 ±9.63	371.31 ±73.79
	35	3.77 ±1.82 ¹⁾	17.96 ±9.62 ¹⁾	298.34 ±37.65 ¹⁾
	70	4.30 ±1.20 ¹⁾	19.45 ±9.93 ¹⁾	298.34 ±37.65 ¹⁾

4 讨论

大鼠在双侧嗅球损毁后会导致很多行为学、内分泌系统、神经系统、免疫系统的异常改变,包括易激惹,自主活动增加,被动回避反应能力欠缺和学习能力下降,以及血中皮质类固醇水平增高等^[5]。由于嗅球损毁大鼠表现出的逃避不能和血中类固醇激素的升高,与临床内源性抑郁病人的特征相似,可作为内源性抑郁症模型进行研究^[6]。所以本研究选择此模型,观察给予白芍提取物后,是否可以纠正嗅球损毁引起的行为异常,以及其是否可以调整嗅球损毁引起的 HPA 轴的功能亢进而发挥抗抑郁作用。

实验结果表明:模型组大鼠嗅球损伤后,敞箱行

为出现明显变化, 水平运动和垂直运动量明显增加(与假手术组比较, $P < 0.05$), 表明大鼠的自发活动增加, 情绪急躁。模型组大鼠在跳台训练期及测试期, 错误次数均明显增多(与假手术组比较, $P < 0.05$), 表明造模后大鼠的学习能力、反应能力和记忆能力降低。白芍提取物中、高剂量可显著降低嗅球损毁大鼠的水平运动和垂直运动(与模型组比较, $P < 0.05$), 表明其能对抗嗅球损毁引起的大鼠自主活动增强; 白芍提取物中、高剂量可显著减少嗅球损毁大鼠训练期和测试期的错误次数(与模型组比较, $P < 0.05$), 表明其能提高模型大鼠的学习记忆能力。

越来越多的研究表明, HPA 轴在抑郁症的发病机制中发挥着重要的作用^[7]。大鼠嗅球损毁后, 投射到嗅球的 5-HT 神经纤维遭到破坏, 5-HT 能神经系统受损, 5-HT 神经元活性降低, 刺激 CRH 分泌, 后者再作用于垂体, 引起 ACTH 分泌增加, 从而导致外周皮质醇分泌增加, 使 HPA 轴过度活化。另一方面, 嗅球损毁作为一种应激方式, 使大鼠 HPA 轴活化, 血中皮质醇升高, 后者降低了嗅球损毁大鼠垂体前 GR 受体的数量和敏感性, 从而降低 ACTH, 皮质醇对应激的负反馈^[8-9]。本研究测定了下丘脑 CRH, 垂体 ACTH 和血清 CORT 的含量, 结果表明, 嗅球损毁后, 大鼠下丘脑的 CRH 和垂体的 ACTH 分泌明显增加, 血中的 CORT 的含量也显著升高, 这与临床抑郁症的内分泌特点一致, 这可能是 HPA 轴过度活化的结果, 给予白芍提取物治疗后, 可减少大鼠下丘脑的 CRH 和垂体的 ACTH 分泌, 并降低血中 CORT 的含量, 这可能是其抗抑郁作用的机制之一。

从结果看, 白芍提取物并没有显示出明显的量效关系, 虽然小剂量无效而中高剂量有效, 但是中剂量和高剂量并无差异。分析原因, 可能是由于所用白芍提取物含 48.89% 芍药苷和 18.99% 芍药内酯

苷, 虽然有报道芍药苷具有抗抑郁作用^[2], 但是芍药内酯苷有无抗抑郁作用还不清楚, 而且两苷的作用特点可能也各不相同, 所以导致提取物的量效关系不明显, 这还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 邵继红, 韩珍, 杨艳, 等. 白芍抗抑郁作用的实验研究[J]. 宁夏医学杂志, 2008, 30(6): 490.
- [2] 崔广智. 芍药苷抗抑郁作用的实验研究[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 231.
- [3] 王景霞, 张建军, 李伟, 等. 白芍提取物治疗抑郁症的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 183.
- [4] 王景霞, 张建军, 钟赣生, 等. 贯郁胶囊对嗅球损毁大鼠行为及中枢单胺类神经递质的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 782.
- [5] Marcilhac A, Maurel D, Anglade G, et al. Effects of bilateral olfactory bulbectomy on circadian rhythms of ACTH, corticosterone, motor activity and body temperature in male rats[J]. Arch Physiol Biochem, 1997, 105(6): 552.
- [6] Song C, Leonard B E. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2005, 29(4/5): 627.
- [7] 路翠艳, 潘芳. 应激反应中 HPA 轴的中枢调控和免疫调节[J]. 中国行为医学科学, 2003, 12(3): 353.
- [8] Marcilhac A, Faudon M, Anglade G, et al. An investigation of serotonergic involvement in the regulation of ACTH and corticosterone in the olfactory bulbectomized rat[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1999, 63(4): 599.
- [9] Xu Y, Ku B S, Yao H Y, et al. Antidepressant effects of curcumin in the forced swim test and olfactory bulbectomy models of depression in rats[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2005, 82(1): 200.

[责任编辑 聂淑琴]