

· 配伍 ·

## 基于均匀设计法评价柴胡-黄芩的配伍比例及抗抑郁机制

周丽萍<sup>1</sup>, 李国春<sup>1</sup>, 章宸一瑜<sup>1</sup>, 赵凡<sup>1</sup>, 李亚芹<sup>1</sup>, 马世平<sup>2</sup>, 瞿融<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学 基础医学院, 医学与生命科学学院, 南京 210029;

2. 中国药科大学 中药学院, 南京 210038)

**[摘要]** **目的:**研究柴胡-黄芩药对发挥抗抑郁功效的最佳配伍比例,探讨其可能的抗抑郁机制。**方法:**取柴胡、黄芩在 2015 年版《中国药典》中的规定用量,按照二因素七水平均匀设计表进行配伍分组。采用慢性不可预见温和应激(CUMS)方法造模,抑郁症模型小鼠灌胃给予柴胡-黄芩不同配伍比例的水煎剂,观察其对模型小鼠糖水偏好、强迫游泳、悬尾、开野等行行为学试验的影响。将所得数据进行回归分析,通过回归方程求解最佳配伍比例。对优选的配伍比例进行验证,并测定小鼠脑海马环磷腺苷反应元件结合蛋白(CREB)磷酸化的水平及脑源性神经营养因子(BDNF)的表达,探讨柴胡-黄芩药对可能的抗抑郁机制。**结果:**与空白组小鼠相比,模型组小鼠糖水偏好率显著降低( $P < 0.01$ ),开野穿格次数显著减少( $P < 0.01$ ),强迫游泳不动时间和悬尾不动时间显著延长( $P < 0.01$ );给予柴胡-黄芩水煎剂可增加模型小鼠的糖水偏好率( $P < 0.05, P < 0.01$ )和穿格次数( $P < 0.05, P < 0.01$ ),缩短强迫游泳不动时间和悬尾不动时间( $P < 0.05, P < 0.01$ )。验证试验显示,柴胡与黄芩配伍后可改善模型小鼠抑郁样行为,增加小鼠的糖水偏好率( $P < 0.01$ ),缩短强迫游泳不动时间和悬尾不动时间( $P < 0.05, P < 0.01$ );柴胡-黄芩(1:1)配伍组及柴胡-黄芩(8:3)配伍组均可显著增加模型小鼠穿格次数( $P < 0.05, P < 0.01$ );柴胡-黄芩(1:1)配伍组在强迫游泳试验和悬尾试验中优于柴胡-黄芩(3:8)和(8:3)配伍组( $P < 0.05, P < 0.01$ ),在糖水偏好试验和开野试验中显著优于柴胡-黄芩(3:8)配伍组( $P < 0.05$ ),且柴胡-黄芩(1:1)配伍组促进海马中 CREB 磷酸化和增加海马中 BDNF 表达的效果最佳。**结论:**柴胡-黄芩药对可改善 CUMS 小鼠抑郁样行为,发挥抗抑郁功效,其最佳配伍比例为 1:1,最佳用量均约为 5 g,其抗抑郁的作用机制可能与促进海马中 CREB 磷酸化和增加海马中 BDNF 表达有关。

**[关键词]** 抑郁症; 柴胡-黄芩; 配伍比例; 均匀设计; 环磷腺苷反应元件结合蛋白; 脑源性神经营养因子; 行为学实验

**[中图分类号]** R22;R24;R28;C37;TS193 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)13-0028-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190451

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181031.1012.020.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-03 17:09

### Evaluation of Compatibility Proportion and Antidepressant Mechanism of Bupleuri Radix-Scutellariae Radix Based on Uniform Design

ZHOU Li-ping<sup>1</sup>, LI Guo-chun<sup>1</sup>, ZHANG Chen-yi-yu<sup>1</sup>, ZHAO Fan<sup>1</sup>, LI Ya-qin<sup>1</sup>, MA Shi-ping<sup>2</sup>, QU Rong<sup>1\*</sup>

(1. School of Medicine and Life Sciences, School of Basic Medicine, Nanjing University of

Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. School of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize proportion of couplet medicine of Bupleuri Radix and Scutellariae Radix in the treatment of anti-depression, and to explore the possible antidepressant mechanism of this couplet medicine. **Method:** The dosages of Bupleuri Radix and Scutellariae Radix in the 2015 edition of

**[收稿日期]** 20180821(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81573701)

**[第一作者]** 周丽萍,在读硕士,从事传统名方的配伍方法、作用机制和临床应用研究,E-mail:sherunlock@sina.com

**[通信作者]** \*瞿融,教授,博士生导师,从事传统名方的配伍方法、作用机制和临床应用研究,Tel:025-85811065, E-mail: qurong@163.com

*Chinese Pharmacopoeia* were taken. According to  $U_7 (7^2)$  uniform design table, *Bupleuri Radix* and *Scutellariae Radix* were carried out into 7 groups. The chronic unpredictable mild depression model mice were induced by intragastric administration of decoction of this couplet medicine and the antidepressant effect was observed by the behavior tests, which included sucrose preference test, tail suspension test, forced swimming test and open field test (crossing scores). The regression equations were established by selecting the effective indexes. The experiments of retest were taken to check the results and the possible antidepressant mechanism was primarily investigated by measuring the phosphorylation level of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) -response element binding protein (CREB) and expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Result:** Compared with the blank group, sucrose preference rate of the model group was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), the number of crossing was also obtained a significant decrease ( $P < 0.01$ ) in the model group, the immobility times of forced swimming and tail suspension were prolonged obviously ( $P < 0.01$ ) in the model group. The decoction of *Bupleuri Radix-Scutellariae Radix* could reverse the above indexes of model mice, the sucrose preference rate and the number of crossing were increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the immobility times of forced swimming was evidently decreased ( $P < 0.01$ ) and the immobility time of tail suspension was also decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The experiment of retest showed that the decoction of *Bupleuri Radix-Scutellariae Radix* could improve depressive behavior of model mice, sucrose preference rates were significantly increased ( $P < 0.01$ ), the immobility time of forced swimming was significantly shorted ( $P < 0.01$ ) and the time of tail suspension was also decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The *Bupleuri Radix-Scutellariae Radix* (1:1) and (8:3) groups could increase the number of crossing ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) of model mice, what's more, the *Bupleuri Radix-Scutellariae Radix* (1:1) group was the most effective than the other groups and it could up-regulate phosphorylation levels of CREB and the expression of BDNF in the hippocampus. **Conclusion:** Compatibility of *Bupleuri Radix* and *Scutellariae Radix* can ameliorate depressive-like behavior of model mice, and the best antidepressant compatibility proportion of *Bupleuri Radix* and *Scutellariae Radix* is 1:1, the optimal amounts of them are about 5 g. The antidepressant effect may relate to promoting phosphorylation level of CREB and the expression of BDNF in the hippocampus.

**[Key words]** depression; *Bupleuri Radix-Scutellariae Radix*; compatibility proportion; uniform design; cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein; brain-derived neurotrophic factor; behavior tests

抑郁症是以持续的心境低落为主要表现的一类疾病,其发病率逐年上升,严重威胁人类的健康<sup>[1]</sup>。《伤寒论》中柴胡类方如柴胡加龙骨牡蛎汤等是中医治疗抑郁症的常用方剂,方中柴胡、黄芩一为君药,一为臣药,是核心药对。柴胡质轻味苦,可疏解少阳;黄芩苦寒味重,清泄邪热,两药配伍可透泄少阳邪气、疏利气机,是临床治疗抑郁症的常用药对之一。

本课题组前期研究证实,柴胡加龙骨牡蛎汤发挥抗抑郁功效主要与方中所含柴胡、黄芩 2 味药物有关<sup>[2]</sup>,且柴胡与黄芩配伍同用较之单味药效果更好<sup>[3-6]</sup>。已有实验研究表明,柴胡与黄芩配伍的用量比例与功效发挥密切相关<sup>[7-9]</sup>,但研究该药对抗抑郁最佳比例及其可能机制的报道尚未见到。本实验采用慢性不可预见温和应激的造模方法,按照均匀设计表规定剂量对抑郁小鼠灌胃给予柴胡-黄芩药对水煎剂,观察该药对抑郁小鼠行为学的影响,根据行为学试验结果拟出回归方程求得最佳配伍比

例,对所求的最佳配伍比例进行验证性实验并测定小鼠海马中磷酸化环磷腺苷反应元件结合蛋白的水平及脑源性神经营养因子的含量,探讨柴胡-黄芩药对抗抑郁的可能机制,为临床治疗抑郁症提供科学依据。

## 1 材料

BSA224S-CW 型电子天平(德国赛多利斯公司),C2500-R-230 微型高速离心机(美国 Labnet 公司),DYZC-24DN 型电泳槽(北京六一生物科技发展有限公司),Gel DocXR<sup>+</sup> 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

柴胡(产地山西,批号 1606052)和黄芩(产地山西,批号 1706082)均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司,经中国药科大学中药资源与开发教研室秦民坚教授鉴定,分别为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* 的干燥根和唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根;盐酸氟西汀片(Flu,常州四药制药有限公司,批号 20170201,购自南京

市先声大药房), 环磷腺苷反应元件结合蛋白 (CREB) 抗体 (南京 Bioworld 公司, 货号 BS4053), 磷酸化 (p-) CREB 抗体和羊抗兔二抗 (美国 Cell Signaling 公司, 货号分别为 9198s, 70745), 脑源性神经营养因子 (BDNF) 抗体 (沈阳万类生物科技有限公司, 货号 w10168), RIPA 裂解液和苯甲基磺酰氟 (PMSF) (上海碧云天生物技术有限公司, 货号分别为 P0013B, ST506), 水为蒸馏水。

清洁级 ICR 小鼠, 体质量 18 ~ 22 g, 由扬州大学比较医学中心提供, 合格证号 SCXK (苏) 2012-0004, 动物分笼饲养, 饲养条件为温度 (22 ± 1) °C, 相对湿度 60%, 12 h/12 h 昼夜节律, 自由饮食、饮水, 保持环境安静, 适应性喂养 1 周后开始实验。本文所涉及的动物实验经中国药科大学伦理委员会批准。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 按照实验分组称取相应比例药材, 分别加入 3 倍量水浸泡 2 h, 加入 7 倍量水煎煮, 煮沸后保持水沸状态 15 min, 将药液倒出, 再加入 10 倍量水煎煮, 煮沸后保持水沸状态 15 min, 将 2 次煮沸的药液用 200 目过滤袋过滤, 60 °C 水浴浓缩为 1 g·mL<sup>-1</sup> 水提液 (按生药量计算); 阳性药 Flu 用水制备成质量浓度为 1.5 g·L<sup>-1</sup> 的溶液, 4 °C 冰箱储存, 稀释后给药。

**2.2 分组及给药** 按 2015 年版《中国药典》中柴胡、黄芩规定剂量 3 ~ 10 g 换算成小鼠给药剂量 0.50 ~ 1.70 g·kg<sup>-1</sup>, 根据 U<sub>7</sub> (7<sup>2</sup>) 均匀设计表<sup>[10]</sup> 将柴胡、黄芩视为 2 个因素, 每味药物的剂量分为 7 个水平, 按均匀设计表分为 7 组。将小鼠随机分为 9 组, 分别为空白组、模型组和 7 个柴胡-黄芩配伍组, 见表 1, 每组 10 只小鼠, 按照表 1 设计的剂量灌胃给药。空白组正常饲养, 其余组采用慢性不可预见温和应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 造模方式, 包括水平震荡 15 min, 禁食 24 h, 禁水 24 h, 夹尾 15 min, 潮湿垫料 24 h, 异物 24 h, 束缚 1 h, 昼夜颠倒。每天随机给予不同刺激, 同一刺激不连续使用, 连续造模 3 周后灌胃给药, 空白组、模型组给予等量水, 给药体积均为 0.02 mL·g<sup>-1</sup>, 除空白组外, 其余组小鼠继续给予刺激并连续给药 3 周。

**2.2.1 糖水偏好试验** 小鼠给药 3 周后适应 48 h 糖水, 禁食、禁水 24 h, 测试每组的糖水消耗。小鼠单笼饲养, 将 1% 蔗糖溶液及普通饮水分别灌入饮水瓶中, 分别记录质量便于测试糖水偏好率 (SP), 计算公式为 SP = 糖水消耗量/总液体消耗

表 1 柴胡-黄芩配伍剂量的均匀设计分析

Table 1 Analysis of dosage and proportion of Bupleuri Radix and Scutellariae Radix based on uniform design

组别	柴胡	黄芩	总剂量 g·kg <sup>-1</sup>
配伍 1	0.50	1.30	1.80
配伍 2	0.70	0.70	1.40
配伍 3	0.90	1.70	2.60
配伍 4	1.10	1.10	2.20
配伍 5	1.30	0.50	1.80
配伍 6	1.50	1.50	3.00
配伍 7	1.70	0.90	2.60

量 × 100%。

**2.2.2 强迫游泳试验<sup>[11]</sup>** 末次给药 1 h 后将小鼠放入 2.5 L 的烧杯中, 注入温度为 25 °C 的水至水深 10 cm 处, 保持实验环境安静, 待小鼠适应 2 min 后记录随后 4 min 累计不动时间, 不动状态的判断标准为小鼠漂浮不动, 除保持口鼻在水面上呼吸的必要动作外, 无其他动作。

**2.2.3 悬尾试验<sup>[12]</sup>** 末次给药 1 h 后在小鼠尾尖 1 cm 处用胶带悬挂于悬尾支架上, 使小鼠倒置, 调整支架高度使小鼠头部距离台面约 25 cm, 用纸板遮住小鼠的视线, 使其免受周围环境的干扰。保持实验环境安静, 在小鼠适应 2 min 后记录随后 4 min 累计不动时间。不动时间的判断标准为除正常呼吸外, 小鼠无其他挣扎动作。

**2.2.4 开野试验<sup>[13]</sup>** 末次给药 1 h 后将小鼠放置于开野敞箱 (直径 30 cm, 高 20 cm) 中心, 保持实验环境安静, 待小鼠适应 2 min 后观察小鼠随后 4 min 内的自发活动 (穿格次数)。每只小鼠完成实验后用 10% 乙醇清洁敞箱, 待敞箱干燥后再继续实验, 以防止小鼠遗留的气味对实验结果的影响。

**2.3 海马组织蛋白测定** 小鼠脱颈处死, 断头取脑, 在冰盒上迅速剥离出海马并称重, 每 1 mg 海马加入裂解液 (RIPA 裂解液: PMSF = 100:1) 4 μL, 玻璃匀浆器冰上匀浆, 离心 (4 °C, 12 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min) 后取上清液, 加入 0.25 倍量上样缓冲液 (5 × Laemmil) 混匀, 放入 -80 °C 冰箱中保存。将玻璃板放入支架, 灌入分离胶、上层胶, 待胶凝结后加入蛋白样品; 将凝胶板放入电泳槽并选取适当电压进行电泳; 采用湿法转膜, 转膜完成后将硝酸纤维素膜放入脱脂牛奶封闭 2 h; 封闭完成后取出膜放入一抗中, 4 °C 孵育过夜, 用含 0.1% 聚山梨酯-20 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, PBST) 清洗 3 遍后放入二抗中, 室温下避光孵育 2 h, 再次用 PBST 清洗 3 遍。采用化学发光法检测灰度值, 利用 Image Lab 3.0 和

Image J 1.8.0 软件进行分析。

**2.4 数据处理** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 22.0 和 Matlab R2018a 软件对数据进行方差分析,并进行多元逐步回归分析, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 行为学测试** 小鼠行为学测试结果显示模型组与空白组比较有显著性差异( $P < 0.01$ ),提示造

模成功。与模型组相比,柴胡-黄芩配伍组均可提高小鼠的 SP( $P < 0.05, P < 0.01$ ),缩短强迫游泳不动时间( $P < 0.01$ )及悬尾不动时间( $P < 0.05, P < 0.01$ ),增加其穿格次数( $P < 0.05, P < 0.01$ ),见表 2。

**3.2 多元回归处理** 将小鼠的行为学数据输入 Matlab R2018a 软件进行多元回归分析,SP 与强迫游泳不动时间数据连续性与拟合度较好

表 2 不同配伍比例柴胡-黄芩对抑郁小鼠行为学试验的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Antidepressant effect of compatibility of Bupleuri Radix and Scutellariae Radix in different proportions( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	总剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	SP/%	强迫游泳不动时间/s	悬尾不动时间/s	穿格数/次
空白	-	85.04 $\pm$ 3.23	36.30 $\pm$ 7.20	30.60 $\pm$ 5.98	141.50 $\pm$ 8.29
模型	-	70.63 $\pm$ 7.72 <sup>1)</sup>	94.60 $\pm$ 5.70 <sup>1)</sup>	73.30 $\pm$ 6.65 <sup>1)</sup>	85.10 $\pm$ 7.49 <sup>1)</sup>
配伍 1	1.80	86.29 $\pm$ 5.10 <sup>2)</sup>	26.60 $\pm$ 7.47 <sup>2)</sup>	22.60 $\pm$ 4.71 <sup>2)</sup>	124.70 $\pm$ 16.08 <sup>2)</sup>
配伍 2	1.40	79.29 $\pm$ 2.15 <sup>3)</sup>	51.70 $\pm$ 9.20 <sup>2)</sup>	47.90 $\pm$ 8.95 <sup>2)</sup>	123.90 $\pm$ 15.49 <sup>2)</sup>
配伍 3	2.60	88.54 $\pm$ 3.70 <sup>2)</sup>	33.60 $\pm$ 6.58 <sup>2)</sup>	43.30 $\pm$ 7.68 <sup>2)</sup>	114.30 $\pm$ 13.72 <sup>3)</sup>
配伍 4	2.20	83.52 $\pm$ 5.17 <sup>2)</sup>	43.80 $\pm$ 11.00 <sup>2)</sup>	58.90 $\pm$ 8.53 <sup>3)</sup>	117.60 $\pm$ 32.36 <sup>3)</sup>
配伍 5	1.80	81.48 $\pm$ 5.94 <sup>3)</sup>	59.50 $\pm$ 4.99 <sup>2)</sup>	61.00 $\pm$ 10.51 <sup>3)</sup>	115.60 $\pm$ 16.99 <sup>3)</sup>
配伍 6	3.00	83.83 $\pm$ 5.59 <sup>2)</sup>	40.40 $\pm$ 4.90 <sup>2)</sup>	46.10 $\pm$ 8.25 <sup>2)</sup>	120.80 $\pm$ 10.33 <sup>2)</sup>
配伍 7	2.60	79.28 $\pm$ 6.31 <sup>3)</sup>	53.30 $\pm$ 8.76 <sup>2)</sup>	58.60 $\pm$ 11.34 <sup>3)</sup>	112.10 $\pm$ 15.24 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.05$ (表 3 和图 3,4 同)。

( $P < 0.05$ ),分别以 SP 和强迫游泳不动时间为因变量( $Y_1, Y_2$ ),柴胡、黄芩给药剂量分别为自变量  $X_1$  和  $X_2$ ,拟合为方程  $Y_1 = 80.55 + 0.34X_1 - 0.31X_2 - 0.02X_1^2 + 0.04X_2^2$  ( $R = 0.884, P < 0.05$ );  $Y_2 = 51.43 + 3.70X_1 - 4.05X_2 - 0.11X_1^2 + 0.08X_2^2$  ( $R = 0.832, P < 0.05$ ),并导出其三维图,见图 1,2。

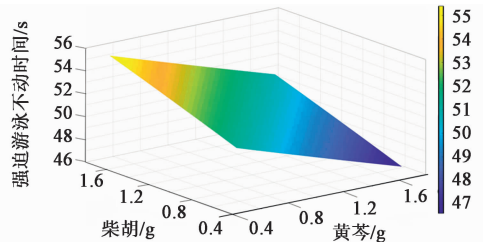


图 2 不同配伍比例柴胡-黄芩对小鼠强迫游泳不动时间影响的三维效应

Fig.2 Three-dimensional space distribution of effect of Bupleuri Radix and Scutellariae Radix in different proportions on immobility time of forced swimming of model mice

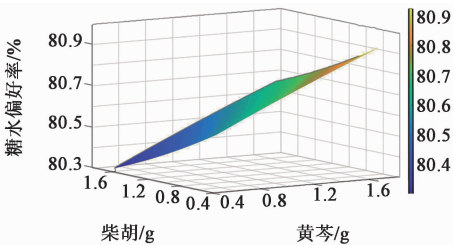


图 1 不同配伍比例柴胡-黄芩对小鼠糖水偏好率影响的三维效应  
Fig.1 Three-dimensional space distribution of effect of Bupleuri Radix and Scutellariae Radix in different proportions on sucrose preference rate of model mice

根据 SP 和强迫游泳不动时间的回归方程,在有效指标为  $SP \leq 100\%$ ,强迫游泳不动时间  $\geq 0$  min 内计算最优值。当柴胡和黄芩的给药剂量分别为 830,916  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,  $Y_2 = 80.57, Y_1 = 50.78$ ,药效

良好,为柴胡-黄芩发挥抗抑郁的最优值,即临床柴胡、黄芩用量分别为 5.0,5.5 g 时,柴胡-黄芩配伍后的抗抑郁效果最佳。当药量增加时,强迫游泳不动时间延长;当药量减低时,SP 下降,此时柴胡与黄芩的配伍比例为 1:1。悬尾不动时间与开野试验穿格次数的数据连续性与拟合度不佳( $P > 0.05$ ),回归方程无意义。

**3.3 验证试验** 柴胡-黄芩(1:1)为抗抑郁最常用比例,此外,柴胡-黄芩(8:3)也为临床常用比例,将近 40 年文献记载抗抑郁方剂中常用药物进行聚类

分析,发现柴胡加龙骨牡蛎汤为聚类所得方剂之一。均匀设计结果提示柴胡-黄芩(1:1)为抗抑郁最佳配伍比例,为验证上述结果,将其与《伤寒论》原书配比[柴胡-黄芩(8:3)]及相反比例[柴胡-黄芩(3:8)]进行比较。小鼠分为 6 组,分别为空白组、模型组、柴胡-黄芩(1:1)配伍组、柴胡-黄芩(3:8)配伍组、柴胡-黄芩(8:3)配伍组以及 Flu 组(阳性药组)。按上述方式造模,并根据均匀设计所得最佳总剂量  $1.70 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃给药,6 周后进行行为学试验并测定海马 p-CREB 及 BDNF 的含量。

**3.3.1 行为学试验** 小鼠行为学试验结果显示,模型组与空白组具有显著性差异( $P < 0.01$ ),说明造模成功。柴胡-黄芩(1:1),柴胡-黄芩(3:8),柴胡-

黄芩(8:3)配伍组均可改善模型小鼠的抑郁样行为,显著提高模型小鼠的 SP( $P < 0.01$ ),显著缩短模型小鼠强迫游泳不动时间( $P < 0.01$ )和悬尾不动时间( $P < 0.05, P < 0.01$ )。柴胡-黄芩(1:1)配伍组及柴胡-黄芩(8:3)配伍组均可显著增加模型小鼠穿格次数( $P < 0.05, P < 0.01$ );柴胡-黄芩(3:8)配伍组与模型组比较,穿格次数虽有增加趋势但无显著性差异。柴胡-黄芩(1:1)配伍组在糖水偏好试验中作用显著优于柴胡-黄芩(3:8)配伍组( $P < 0.05$ ),在强迫游泳试验和悬尾不动试验中显著优于柴胡-黄芩(3:8)配伍组及柴胡-黄芩(8:3)配伍组( $P < 0.05, P < 0.01$ ),在开野实验中显著优于柴胡-黄芩(3:8)配伍组( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 不同配伍比例柴胡-黄芩对小鼠行为学影响的验证试验( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Verification test of antidepressant effect of compatibility of Bupleuri Radix and Scutellariae Radix in different proportions( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	SP/%	强迫游泳不动时间/s	悬尾不动时间/s	穿格数/次
空白	-	87.33 ± 4.16	40.50 ± 5.26	41.38 ± 6.18	111.10 ± 13.01
模型	-	57.17 ± 7.58 <sup>1)</sup>	101.90 ± 11.96 <sup>1)</sup>	74.13 ± 6.19 <sup>1)</sup>	84.13 ± 5.16 <sup>1)</sup>
Flu	$1.50 \times 10^{-5}$	83.75 ± 5.04 <sup>2)</sup>	51.50 ± 4.72 <sup>2)</sup>	51.63 ± 8.48 <sup>2)</sup>	108.50 ± 9.62 <sup>2)</sup>
柴胡-黄芩(1:1)配伍	1.70	85.54 ± 4.78 <sup>2)</sup>	65.75 ± 5.80 <sup>2)</sup>	51.97 ± 5.89 <sup>2)</sup>	103.95 ± 7.90 <sup>2)</sup>
柴胡-黄芩(3:8)配伍	1.70	78.95 ± 3.80 <sup>2,5)</sup>	76.75 ± 7.92 <sup>2,5)</sup>	63.70 ± 7.96 <sup>3,4)</sup>	95.38 ± 8.77 <sup>5)</sup>
柴胡-黄芩(8:3)配伍	1.70	82.46 ± 5.92 <sup>2)</sup>	75.88 ± 7.31 <sup>2,5)</sup>	62.73 ± 5.44 <sup>3,5)</sup>	100.00 ± 6.97 <sup>3)</sup>

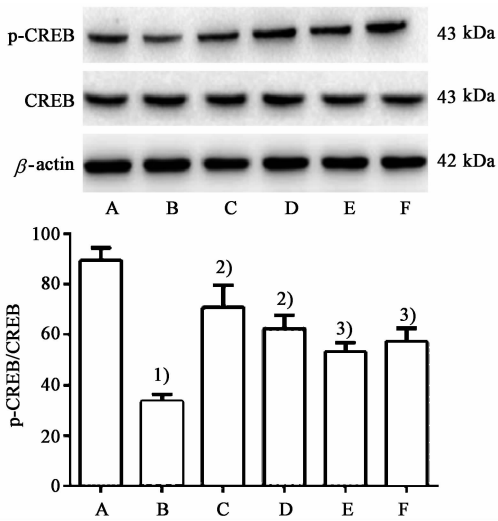
注:与柴胡-黄芩(1:1)配伍组比较<sup>4)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>5)</sup> $P < 0.05$ (图 4 同)。

**3.3.2 海马组织 p-CREB 和 BDNF 表达的检测** 小鼠海马蛋白含量测定结果显示,与空白组相比,模型组小鼠海马中 CREB 磷酸化水平显著降低( $P < 0.01$ );与模型组相比,3 个柴胡-黄芩配伍组抑郁小鼠海马中 CREB 的磷酸化水平均有增加( $P < 0.05, P < 0.01$ );与柴胡-黄芩(3:8)和(8:3)配伍组比较,柴胡-黄芩(1:1)配伍组可提高抑郁小鼠海马中 CREB 的磷酸化水平,但无显著性差异;见图 3。与空白组相比,模型组小鼠海马中 BDNF 含量显著降低( $P < 0.01$ );与模型组相比,柴胡-黄芩(1:1)和(8:3)配伍组小鼠海马中 BDNF 含量显著增加( $P < 0.05, P < 0.01$ );柴胡-黄芩(1:1)配伍组与柴胡-黄芩(8:3)配伍组相比,可增加 BDNF 的表达,但无显著性差异,而与柴胡-黄芩(3:8)配伍组相比则可显著增加 BDNF 的表达( $P < 0.05$ );见图 4。综上所述,柴胡-黄芩发挥抗抑郁功效的最佳配伍比例为 1:1。

**4 讨论**

均匀设计试验中每个因素、水平仅需进行 1 次实验,每 2 个因素有且仅有 1 个实验点,相较于其他

实验方案,均匀设计极大地减少了实验次数与成本。近年来,该方法已被越来越多地被运用于中药复方配伍比例研究、制备工艺筛选等领域<sup>[14-15]</sup>。抑郁症的发病机制尚不明确,其发病假说主要有单胺类神经递质假说、神经营养因子假说、神经内分泌假说、炎症因子假说等<sup>[16]</sup>。其中神经营养因子假说认为神经营养因子的改变为抑郁症的可能发病机制之一<sup>[17]</sup>。海马神经元的损伤与抑郁症发生密切相关<sup>[18]</sup>,BDNF 为脑内重要的神经营养因子,参与神经元的增殖、迁移及分化<sup>[19]</sup>,对海马神经元有一定的保护作用<sup>[20]</sup>。临床研究表明抑郁症患者血清 BDNF 水平下降,给予抗抑郁治疗后血清 BDNF 含量增加<sup>[21-22]</sup>。CREB 是脑内重要的核转录蛋白,CREB 磷酸化可诱导 BDNF 的转录与表达,发挥抗抑郁的功效。抑郁症患者脑内 p-CREB 及 BDNF 会下降,而抗抑郁药物可增加其表达<sup>[20]</sup>。研究表明含柴胡-黄芩药对的方剂及其主要组成成分(如小柴胡汤<sup>[23]</sup>,柴胡皂苷 A<sup>[24]</sup>,柴胡皂苷 D<sup>[25]</sup>,黄芩素<sup>[26]</sup>,黄芩苷<sup>[27]</sup>等)均可以通过调节 p-CREB, BDNF 及其



A. 空白组; B. 模型组; C. Flu 组; D. 柴胡-黄芩(1:1) 配伍组; E. 柴胡-黄芩(3:8) 配伍组; F. 柴胡-黄芩(8:3) 配伍组(图 4 同)

图 3 各组小鼠脑海马组织中 CREB 磷酸化水平的测定 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Phosphorylation levels of CREB in hippocampus of mice from each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

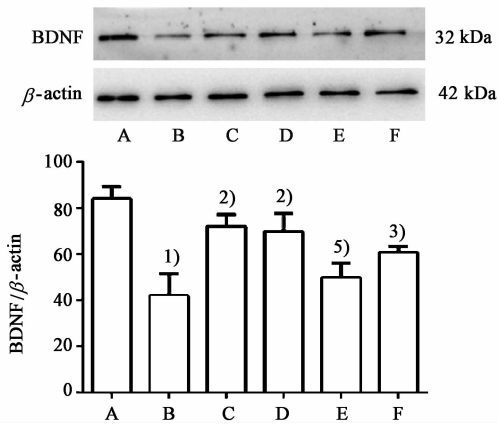


图 4 各组小鼠脑海马组织中 BDNF 表达的测定 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Expression of BDNF in hippocampus of mice from each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

下游蛋白的表达发挥抗抑郁功效。行为学试验是评价抑郁模型是否成功以及抗抑郁药物是否有效的标准之一,糖水偏好用来评测小鼠的快感缺乏程度<sup>[28]</sup>,开野试验反映小鼠的自发活动及探索行为,强迫游泳不动时间和悬尾不动时间反映了小鼠的行为绝望程度<sup>[29]</sup>。本文根据 2015 年版《中国药典》记载的柴胡、黄芩常用剂量,按照  $U_7(7^2)$  均匀设计表,取 7 个剂量梯度水平进行配伍,采用 CUMS 方法造模,通过行为学试验观察其抗抑郁功效,并对实验结果进行回归分析,以求得柴胡与黄芩的最佳配伍比例。

本文研究结果显示,柴胡与黄芩配伍可改善小鼠的抑郁样行为,经回归分析得出柴胡-黄芩(1:1)为抗抑郁最佳比例。验证试验结果显示,柴胡-黄芩(1:1)配伍组在强迫游泳试验及悬尾试验中显著优于其余 2 组,且在糖水偏好试验、开野试验中显著优于柴胡-黄芩(3:8)配伍。在脑海马蛋白测定中,柴胡-黄芩(1:1)和(8:3)配伍组均可显著提高抑郁小鼠脑内 CREB 的磷酸化水平及 BDNF 的表达,且柴胡-黄芩(1:1)配伍组的效果更好。本文研究结果表明柴胡-黄芩抗抑郁的最佳配伍比例为 1:1,这与临床治疗抑郁症的常用比例是一致的;柴胡-黄芩(8:3)为经典名方柴胡加龙骨牡蛎汤中记载的比例,也可改善小鼠抑郁样行为,发挥抗抑郁的功效;柴胡-黄芩药对可通过增加脑内 CREB 的磷酸化来促进 BDNF 的表达,保护海马神经元细胞,从而发挥抗抑郁的功效,此为柴胡-黄芩药对抗抑郁的可能机制之一。但抑郁症的发病机制甚为复杂,有关柴胡-黄芩抗抑郁的最佳配比还需要进一步验证,其作用机制也有待深入研究。后续将进一步验证柴胡-黄芩的最佳配伍比例,同时在保护海马神经元与抑制脑海马神经元凋亡方面对其可能的抗抑郁机制进行深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Belmaker R H, Agam G. Major depressive disorder[J]. N Engl J Med, 2008, 358(1): 55-68.
- [2] ZHU W, MA S P, QU R, et al. Antidepressant-like effect of saponins extracted from Chaihu-jia-longgu-muli-tang and its possible mechanism[J]. Life Sci, 2006, 79(8): 749-756.
- [3] LIU Y D, MA S P, QU R. SCLM, total saponins extracted from Chaihu-jia-longgu-muli-tang, reduces chronic mild stress-induced apoptosis in the hippocampus in mice[J]. Pharm Biol, 2010, 48(8): 840-848.
- [4] LI L F, LU J, LI X M, et al. Antidepressant-like effects of the saponins extracted from Chaihu-jia-longgu-muli-tang in a rat unpredictable chronic mild stress model[J]. Fitoterapia, 2012, 83(1): 93-103.
- [5] LI S, SUN X, XU L, et al. Baicalin attenuates *in vivo* and *in vitro* hyperglycemia-exacerbated ischemia/reperfusion injury by regulating mitochondrial function in a manner dependent on AMPK[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 815: 118-126.
- [6] YU H Y, YIN Z J, YANG S J, et al. Baicalin reverses depressive-like behaviours and regulates apoptotic signalling induced by olfactory bulbectomy[J]. Phytother

- Res, 2016, 30(3):469-475.
- [ 7 ] 陈慧慧,张敏,虞慧娟,等.柴胡和黄芩配伍解热抗炎作用研究[J].中成药,2011,33(9):1596-1598.
- [ 8 ] 刘芳,王雪峰,闫丽娟,等.黄芩柴胡及其配伍提取物对心肌炎小鼠心肌组织 CVB3 mRNA 复制及 IFN mRNA 表达的影响[J].中华中医药学刊,2010,28(8):1601-1604.
- [ 9 ] 孙付军,陈慧慧,王春芳,等.柴胡、黄芩药对利胆作用研究[J].中成药,2011,33(8):1418-1420.
- [10] 方开泰.均匀设计及其应用(Ⅲ)[J].数理统计与管理,1994,13(3):52-55.
- [11] Porsolt R D, Bertin A, Jalfre M. Behavior despair in mice: a primary screening test for antidepressants[J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1977, 229(2):327-336.
- [12] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. Psychopharmacology ( Berlin ), 1985, 85 ( 3 ) : 367-370.
- [13] Archer J. Tests for emotionality in rats and mice; are view[J]. Anim Behav, 1973, 21(2):205-235.
- [14] 陈银芳,余日跃,业康,等.均匀设计-偏最小二乘回归结合因子分析探索大黄-厚朴组分配伍的规律[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(13):8-12.
- [15] 钱大玮,朱玲英,段金廛,等.用均匀设计优化黄芪皂苷提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(6):1-3.
- [16] 宋明.抑郁症肝郁脾虚证大鼠海马星形胶质细胞 GFAP 与 Glu-NMDA-CORT 受体通路的变化及逍遥散的调节作用[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [17] Duman R S, Monteggia L M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders [J]. Bio Psychiatry, 2006, 59(12):1116-1127.
- [18] Elhwuegi A S. Central monoamines and their role in major depression [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2004, 28(3):435-451.
- [19] Gray J D, Milner T A, McEwen B S. Dynamic plasticity: the role of glucocorticoids, brain-derived neurotrophic factor and other trophic factors [J]. Neuroscience, 2013, 239:214-227.
- [20] 彭淑芹,徐向东,赵海霞.四逆散对抑郁模型大鼠 HPA 轴、海马 BDNF 及其受体 TrkB 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(5):145-148.
- [21] Wilkinson S T, Kiselyzyk C, Banasr M, et al. Serum and plasma brain-derived neurotrophic factor and response in a randomized controlled trial of riluzole for treatment resistant depression [J]. J Affect Disord, 2018, 241(8):514-518.
- [22] 张煜萱,崔博,邹之路,等.越鞠丸治疗气郁体质抑郁症患者及改善血清 BDNF 水平的临床对照研究[J].辽宁中医杂志,2018,45(5):960-963.
- [23] SU G Y, YANG J Y, WANG F, et al. Antidepressant-like effects of Xiaochaihutang in a rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 152(1):217-226.
- [24] CHEN X Q, CHEN S J, LIANG W N, et al. Saikosaponin A attenuates perimenopausal depression-like symptoms by chronic unpredictable mild stress [J]. Neurosci Lett, 2018, 662:283-289.
- [25] LI H Y, ZHAO Y H, ZENG M J, et al. Saikosaponin D relieves unpredictable chronic mild stress induced depressive-like behavior in rats; involvement of HPA axis and hippocampal neurogenesis [J]. Psychopharmacology ( Berlin ), 2017, 234(22):3385-3394.
- [26] 栗俞程,沈继朵,刘亚敏,等.黄芩主要黄酮成分的抗抑郁活性筛选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):166-169.
- [27] YU H Y, YIN Z J, YANG S J, et al. Baicalin reverse AMPA receptor expression and neuron apoptosis in chronic unpredictable mild stress rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 451(4):467-472.
- [28] YAN L, HU Q, Mak M S, et al. A Chinese herbal decoction, reformulated from Kai-Xin-San, relieves the depression-like symptoms in stressed rats and induces neurogenesis in cultured neurons [J]. Sci Rep, 2016, doi:10.1038/srep30014.
- [29] Shetty R A, Sadananda M. Brief social isolation in the adolescent Wistar-Kyoto rat model of endogenous depression alters corticosterone and regional monoamine concentrations [J]. Neurochem Res, 2017, 42(5):1470-1477.

[责任编辑 刘德文]