

- [J]. *Diabetes*, 2004, 53(Suppl 1): S43-S50.
- [20] Wu W L, Gan W H, Tong M L, *et al.* Over-expression of NYGGF4 (PID1) inhibits glucose transport in skeletal myotubes by blocking the IRS1/PI3K/AKT insulin pathway [J]. *Mol Genet Metab*, 2011, 102(3): 374-377.
- [21] Park Y J, Ahn H J, Chang H K, *et al.* The RhoGDI-alpha/JNK signaling pathway plays a significant role in mycophenolic acid-induced apoptosis in an insulin-secreting cell line[J]. *Cell Signal*, 2009, 21(2): 356-364.

藏药佐太在两种抑郁小鼠模型中的抗抑郁活性

赵 静^{1,2,3}, 张 明^{1,2,3}, 耿卢婧^{1,2,3}, 李 岑^{1,2}, 杜玉枝^{1,2}, 魏立新^{1,2*}

(1. 中国科学院藏药研究重点实验室, 青海 西宁 810001; 2. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海省藏药药理学和安全性评价研究重点实验室, 青海 西宁 810001; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 目的 通过行为绝望模型—悬尾实验 (TST)、不可预测性慢性温和应激 (CUMS) 模型, 探索藏药佐太 (硫化汞、硫磺等煅制品的混合物) 的抗抑郁作用。方法 行为绝望模型—悬尾实验中, KM 小鼠给予佐太 14 d 后, 通过测定悬尾实验不动时间、开场实验 (OFT)、血清中皮质酮 (CORT) 变化, 评价佐太的抗抑郁活性。构建 CUMS 模型 KM 小鼠, 给予佐太 42 d, 通过糖水偏好实验、开场实验和强迫游泳实验, 进一步评价佐太的抗抑郁作用。通过 ELISA 法测定小鼠血清中 5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE) 和海马中脑源性神经营养因子 (BDNF) 的水平。结果 行为绝望模型—悬尾实验中, 与空白组相比, 佐太在剂量为 60.697、303.49 mg/kg 时能显著降低小鼠悬尾不动时间和血清中 CORT 水平。CUMS 模型实验中, 与 CUMS 模型组相比, 佐太在剂量为 6.069 7、60.697、606.97 mg/kg 时, 均可显著提高受试小鼠的糖水偏好率、开场实验中的自主活动, 同时可显著降低强迫游泳实验 (CFST) 中的不动时间, 表明佐太能缓解慢性应激引起的抑郁样行为。另外, 佐太在上述 3 个剂量下, 可显著增加 CUMS 模型小鼠血清中 NE 和海马中 BDNF 的水平, 并在剂量为 6.069 7、60.697 mg/kg 下, 可显著增加 CUMS 模型小鼠血清中 5-HT 的水平。结论 藏药佐太在行为绝望模型和 CUMS 模型小鼠中表现出一定的抗抑郁活性, 可能是通过降低 CORT, 提高 5-HT、NE、BDNF 的水平而发挥作用。

关键词: 佐太; 抗抑郁; 悬尾实验; CUMS 模型; 皮质酮; 5-羟色胺; 去甲肾上腺素; 脑源性神经营养因子

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)07-1461-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.07.005

Antidepressant activities of Tibetan medicine Zuotai in two mouse depression models

ZHAO Jing^{1,2,3}, ZHANG Ming^{1,2,3}, GENG Lu-jing^{1,2,3}, LI Cen^{1,2}, DU Yu-zhi^{1,2}, WEI Li-xin^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Qinghai Provincial Key Laboratory of Tibetan Medicine Pharmacology and Safety Evaluation; Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

ABSTRACT: **AIM** To use behavioral despair-tail suspension test (TST) model and chronic unpredictable mild stress (CUMS) model to evaluate the antidepressant activity of Tibetan medicine Zuotai (a mixture of HgS, sulfur, etc.). **METHODS** In 14-day treatment with Zuotai, the immobility time in TST, open field test (OFT) and serum corticosterone (CORT) level in KM mice in TST as behavioral despair model were measured to estimate the an-

收稿日期: 2015-10-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81374063); 青海省重点实验室发展专项 (2014-Z-Y02); 中国科学院“西部之光”重点项目 (Y529021211)

作者简介: 赵 静 (1990—), 女, 硕士生, 研究方向为藏药药理学。Tel: (0971) 6143765, E-mail: zhaojing240026@163.com

* 通信作者: 魏立新 (1967—), 男, 研究员, 研究方向为藏药药理学。Tel: (0971) 6143668, E-mail: lxwei@nwipb.cas.cn

tidepressant effect. In 42-day treatment with Zuotai, CUMS model was further analyzed for the improvement in depressive symptoms, comprising the sucrose-preference test, OFT and forced swimming test (FST). 5-hydroxytryptamine (5-HT), norepinephrine (NE) concentrations in serum and brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression in hippocampus were determined by ELISA. **RESULTS** The behavioral despair mice model showed that Zuotai at doses of 60.697 and 303.49 mg/kg significantly reduced the immobility time in TST and level of serum CORT. The experimental results of CUMS model revealed that Zuotai at doses of 6.069 7, 60.697 and 606.97 mg/kg could markedly alleviate the CUMS-induced depression-like behaviors, including increasing sucrose consumption index and locomotor activity in OFT, and reducing immobility time in forced swimming test (FST). In addition, NE concentrations in serum and BDNF in hippocampus were significantly increased in mice after receiving Zuotai at doses of 6.069 7, 60.697 and 606.97 mg/kg. 5-HT concentration in serum was significantly increased in mice after receiving Zuotai at doses of 6.069 7 and 60.697 mg/kg. **CONCLUSION** Tibetan medicine Zuotai possesses potential antidepressant activity in the behavioral despair and CUMS models of mice, which may be mediated through decreasing CORT level, and increasing 5-HT, NE levels and BDNF concentration.

KEY WORDS: Zuotai; antidepressant; TST (tail suspension test); CUMS (chronic unpredictable mild stress) model; CORT (corticosterone); 5-HT; NE (norepinephrine); BDNF (brain derived neurotrophic factor)

抑郁症 (depression) 是一类严重的精神情志障碍性疾病, 具有高患病率、高复发率、高致死率等特点^[1]。据世界卫生组织 (WHO) 统计, 目前, 全球约有 3.5 亿人正不同程度的遭受抑郁症的折磨, 预计到 2030 年将成为全球首要疾病负担^[2]。现在, 抗抑郁药物的种类虽多, 但对抑郁症完全缓解率尚不足 50%^[3], 并且伴随着许多不可忽视的副作用^[4], 亟需“高效、低毒”的治疗药物。而从传统药物中挖掘抗抑郁药物, 已成为一个新的重要研究方向。

藏医药是我国特有的重要医药资源, 是藏族人民在上千年的生产生活实践中逐步形成并不断发展的医药学科^[5]。佐太又称“甘露精王”, 始载于老玉妥·云丹贡布所著的《四部医典》(公元 8 世纪), 应用面广, 是珍宝类藏成药的核心配伍成分, 这些含佐太的复方制剂主要用于治疗中风、麻痹病、阳痿、高血压、神经系统及心血管障碍、肝胆胃肠疾病等。佐太主要原料为水银和硫磺, 经过洗、涤、煮等多道复杂炮制工艺, 去垢、去锈、除汞毒, 然后加以多种重金属, 煅炭存性而成的水银灰药^[6-7]。现代研究表明^[8], 佐太可对中枢神经产生一定的影响, 如有减少正常小鼠自发活动的趋势, 降低土的宁致惊厥率和延长惊厥诱导时间等。但迄今尚未见到佐太抗抑郁方面的研究报道。

为此, 本研究利用抗抑郁药初筛模型—行为绝望模型 (小鼠悬尾实验), 通过测定悬尾实验中不动时间、开场实验中自主活动、血清中皮质酮 (CORT) 水平, 初步评价佐太的抗抑郁作用; 利

用构建的不可预测性慢性温和应激 (CUMS) 抑郁模型小鼠, 通过糖水偏好实验、开场实验、强迫游泳实验进一步评价佐太的抗抑郁作用, 并测定小鼠血清中 5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE) 以及海马中脑源性神经营养因子 (BDNF) 的水平变化, 以探讨佐太可能的抗抑郁机制。

1 材料

1.1 实验动物 SPF 级 KM 小鼠, 雄性, 体质量 22~24 g, 购自甘肃中医学院实验动物中心, 许可证号 SCXK (甘) 2008-006-0000405。所有实验动物饲养于 SPF 级动物房内, 恒温恒湿环境, 机械通风, 人工光照, 昼夜循环 12 h, 食物和饮水自由获取。

1.2 药品和试剂 佐太 (于 2010 年 7 月 5 日购自西藏自治区藏药厂, 用 2% 淀粉溶液促悬); 盐酸丙咪嗪 (98%, 德国 3B Scientific 公司); 皮质酮酶联免疫检测试剂盒 (CORT, 南京建成生物工程研究所); 5-羟色胺酶联免疫检测试剂盒 (CEA808Ge, 美国 Cloud-Clone 公司); 去甲肾上腺素酶联免疫检测试剂盒 (CEA907Ge, 美国 Cloud-Clone 公司); 脑源性神经营养因子酶联免疫检测试剂盒 (SEA011Mu, 美国 Cloud-Clone 公司); 氯化钠 (PT); 磷酸二氢钠 (AR); 磷酸二氢钾 (AR); 氯化钾 (AR); 无水乙醇 (AR); 2% 淀粉浆 (将 2 g 食用淀粉和 100 mL 蒸馏水加入 500 mL 烧杯中, 煮沸后冷却, 即得)。

1.3 仪器 超纯水仪 (Milli-QReference, 美国 Millipore 公司); 十万分之一电子天平 (ME204, 瑞士

Mettler Toledo 公司); 多功能酶标仪 (Enspire 2300, 美国 Perkin Elmer 公司); PH 计 (PB10, 德国 Sartorius 公司); 高速冷冻离心机 (Sigma 3K-15, 美国 Sigma 公司); 恒温磁力搅拌器 (85-2A, 金坛市科析仪器有限公司); 高通量组织研磨器 (Scientz-48, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 大小鼠开场活动实验系统 (OFT-100, 成都泰盟软件有限公司); 视频编辑专家 (Ver 8.2, 北京锐动天地信息技术有限公司); 微量移液器 (美国 Thermo Electron 公司)。

2 方法

2.1 行为绝望模型—悬尾实验

2.1.1 动物分组与给药处理 40 只雄性 KM 小鼠适应环境 1 周后随机分为 5 组, 每组 8 只, 分别为空白组、佐太 6.069 7 mg/kg (小鼠佐太临床等效剂量) 组、佐太 60.697 mg/kg 组、佐太 303.49 mg/kg 组、丙咪嗪 15 mg/kg 组。每日给药 1 次, 给药体积为 10 mL/kg, 连续给药 14 d。第 14 天进行开场实验, 第 15 天进行小鼠悬尾实验, 第 16 天摘眼球取血。

2.1.2 悬尾实验^[9] 实验前 60 min, 将小鼠移至一间安静的测试房, 以减少动物紧张感。实验时将小鼠尾巴用胶带固定起来悬挂在实验架上, 实验持续 6 min, 全程通过高清数码摄像机记录实验过程, 然后双盲方式统计后 4 min 内小鼠不动的总时间。

2.1.3 开场实验^[10] 采用开场实验评价小鼠自主活动情况。实验前 60 min, 将小鼠移到开场实验测试房, 实验时将小鼠从笼中取出, 置于开场实验装置 (525 mm × 525 mm × 415 mm) 中央, 并迅速拉上实验站遮光罩帘。在操作软件中记录小鼠编号、日期、状态后打开记录系统, 通过开场设备上方的摄像机及与其相连的监视器观察 5 min 内小鼠的活动情况, 包括静止时间、运动距离等。实验结束后将小鼠放回笼内, 用 70% 乙醇彻底擦拭实验装置, 并用纸巾擦干。

2.1.4 皮质酮 (CORT) 水平检测 小鼠禁食 12 h 后, 于第 16 天摘眼球取血, 置于促凝管中, 室温放置 1 h, 4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min, 取上清置于 1.5 mL EP 管内, -80 ℃ 保存。按照皮质酮酶联免疫试剂盒说明书操作, 检测 CORT 水平。

2.2 CUMS 模型实验

2.2.1 动物分组和给药方式 60 只雄性 KM 小鼠适应环境 1 周后随机分为 6 组, 每组 10 只, 分别为空白组、CUMS 组、CUMS + 佐太 6.069 7 mg/kg

组、CUMS + 佐太 60.697 mg/kg 组、CUMS + 佐太 606.97 mg/kg 组、CUMS + 丙咪嗪 15 mg/kg 组。每日灌胃给药 1 次, 给药体积为 10 mL/kg, 连续给药 42 d。第 0、42 天进行糖水偏好实验, 第 43 ~ 44 天进行开场实验, 第 45 天进行强迫游泳实验, 第 46 天摘眼球取血后断颈取组织。

2.2.2 CUMS 模型造模方法 不可预测性慢性温和应激 (CUMS) 模型采用 Katz、Willner 等人的描述, 并在此基础上进行稍加修改^[11-12]。所有小鼠进行单笼饲养, 空白组不予任何刺激, 其余各组在 42 d 内给予不同的慢性应激刺激。应激方式包括: ①剥夺食物 24 h, ②剥夺饮水 24 h, ③倾斜笼子 45 度角 24 h, ④群养 2 h, ⑤束缚应激 2 h, ⑥夜间照明, ⑦夹尾 15 min, ⑧ 4 ~ 8 ℃ 冷水游泳 5 min, ⑨暴露异物 24 h, ⑩空水瓶。以上应激方式顺序随机但同一应激方式不连续应用, 以使小鼠不能预知给予的应激方式。

2.2.3 糖水偏好实验^[12] 实验进行前 72 h 进行糖水适应训练, 于每笼中同时放置两个水瓶, 一瓶装有 1% 糖水溶液, 另一瓶装有自来水, 每 12 h 更换两个水瓶所在位置一次。适应糖水后, 对小鼠同时剥夺食物和饮水 23 h。糖水偏好实验实施于第 0 天和第 42 天晚上 7:00, 每笼小鼠同时给予一瓶装有 1% 糖水和一瓶装有自来水的水瓶, 让其自由饮水, 2 h 后测定糖水和自来水消耗量, 计算糖水偏好率, 公式为糖水偏好率 = 糖水消耗量 / (糖水消耗量 + 自来水消耗量) × 100%。

2.2.4 强迫游泳实验^[12-13] 实验前 60 min, 将小鼠移至一间安静的测试房, 以减少动物紧张感。实验时将小鼠置于水深 10 cm、直径 14 cm、水温 (23 ± 2) ℃ 左右的上方开口圆柱形玻璃容器中, 持续 6 min, 全程通过高清数码摄像机记录实验过程, 然后双盲方式统计后 4 min 内小鼠不动的总时间。不动时间定义为小鼠在水中停止挣扎、漂浮于水面以及为了保持头部浮在水面的轻微游动。

2.2.5 5-羟色胺 (5-HT) 和去甲肾上腺素 (NE) 水平检测 小鼠禁食 12 h 后, 于第 46 天摘眼球取血, 置于促凝管中, 室温放置 1 h, 4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min, 取上清置于 1.5 mL EP 管内, -80 ℃ 保存。按照 5-HT、NE 的酶联免疫试剂盒说明书操作, 测定两者水平。

2.2.6 脑源性神经营养因子 (BDNF) 水平检测 小鼠摘眼球取血后, 颈椎脱臼处死, 取脑, 置于冰台上, 分离称取海马组织, 放入 1.5 mL EP 管

中,加入36倍PBS(pH 1.0~2.0)后,在组织匀浆器(频率60 Hz、转速1 800次/min)中匀浆2 min,于4℃条件下5 000×g离心5 min,取上清液,-80℃保存待测。按照脑源性神经营养因子酶联免疫试剂盒说明书操作,测定BDNF水平。

2.3 统计分析 所有实验数据结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 21统计软件分析,数据分析采用one-way ANOVA分析,Post Hoc分析采用LSD法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 行为绝望模型—悬尾实验

3.1.1 佐太对小鼠悬尾实验不动时间的影响 如图1所示,与空白组相比,60.697、303.49 mg/kg佐太组和15 mg/kg丙咪嗪组小鼠悬尾不动时间显著减少($P < 0.05$, $P < 0.01$),而6.069 7 mg/kg佐太组小鼠悬尾不动时间较空白组增加,但没有显著性差异($P > 0.05$)。

3.1.2 佐太对小鼠自主活动的影响 如表1所示,

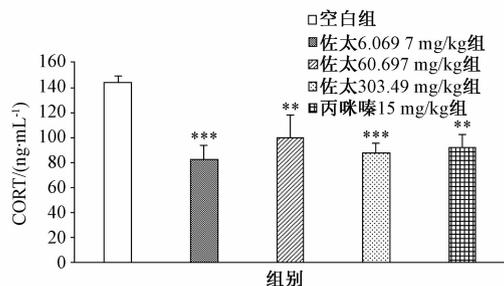
表1 佐太对小鼠开场实验中自主活动的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab.1 Effect of Zuotai on locomotor activity in open-field test of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	静止时间/s	运动时间/s	运动距离/cm
空白组	77.90 ± 9.40	222.16 ± 9.40	2 694.04 ± 348.41
佐太6.069 7 mg/kg组	128.79 ± 26.80***	181.98 ± 26.55***	1 961.13 ± 307.20***
佐太60.697 mg/kg组	103.02 ± 13.59**	195.91 ± 15.14**	2 197.23 ± 353.47**
佐太303.49 mg/kg组	96.38 ± 21.77*	203.69 ± 21.77*	2 271.54 ± 150.33**
丙咪嗪15 mg/kg组	105.48 ± 18.46**	197.58 ± 19.46**	2 011.32 ± 339.08***

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

3.1.3 佐太对小鼠CORT水平的影响 如图2所示,与空白组相比,6.069 7、60.697、303.49 mg/kg佐太组和15 mg/kg丙咪嗪组小鼠血清中CORT水平显著降低($P < 0.01$, $P < 0.001$)。



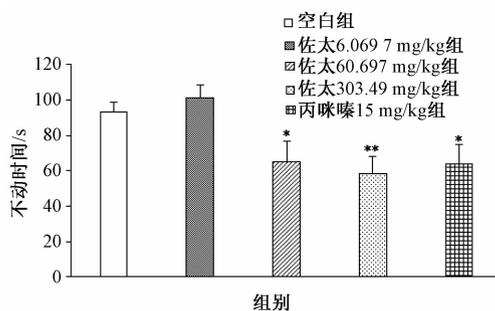
注:与空白组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

图2 佐太对小鼠血清CORT水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig.2 Effect of Zuotai on CORT level in serum of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

3.2 CUMS模型实验

3.2.1 佐太对CUMS模型小鼠糖水偏好率的影响 在CUMS应激进行第0天和第42天分别进行糖



注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图1 佐太对小鼠悬尾实验不动时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig.1 Effect of Zuotai on immobility time in tail suspension test of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

与空白组相比,6.069 7、60.697、303.49 mg/kg佐太组和15 mg/kg丙咪嗪组静止时间显著增加,运动时间显著减少($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$),运动距离显著缩短($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

水偏好实验,评价各组动物的快感缺乏状态。如表2所示,在第0天,各组小鼠糖水偏好率无显著性差异($P > 0.05$)。在第42天,与空白组相比,CUMS组小鼠糖水偏好率显著降低($P < 0.001$);与CUMS组相比,6.069 7、60.697、606.97 mg/kg佐太组和15 mg/kg丙咪嗪组小鼠糖水偏好率显著增加($P < 0.001$)。

表2 佐太对CUMS小鼠糖水偏好率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab.2 Effect of Zuotai on sucrose preference index in CUMS mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	糖水偏好率/%	
	0 d	42 d
空白组	84.51 ± 5.24	81.28 ± 14.36
CUMS组	86.06 ± 2.21	43.30 ± 26.09***
CUMS + 佐太6.069 7 mg/kg组	85.37 ± 2.48	87.52 ± 4.12***
CUMS + 佐太60.697 mg/kg组	86.00 ± 1.95	79.81 ± 27.51***
CUMS + 佐太606.97 mg/kg组	81.82 ± 3.70	81.90 ± 10.52***
CUMS + 丙咪嗪15 mg/kg组	86.78 ± 3.96	79.66 ± 13.05***

注:与空白组比较,*** $P < 0.001$;与CUMS组比较,*** $P < 0.001$

3.2.2 佐太对 CUMS 模型小鼠开场实验的影响
如表 3 所示, 与空白组相比, CUMS 组小鼠静止时间显著增加 ($P < 0.01$), 运动距离显著减少 ($P < 0.05$); 与 CUMS 组相比, 6.069 7、60.697、606.97 mg/kg 佐太组和丙咪嗪 15 mg/kg 组小鼠静止时间显著减少 ($P < 0.05$, $P < 0.001$), 运动距离显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。

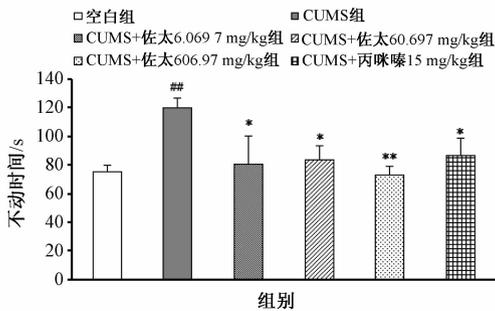
表 3 佐太对 CUMS 模型小鼠开场实验的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 3 Effect of Zuotai on open-field test in CUMS mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	静止时间/s	运动距离/cm
空白组	61.83 ± 9.18	2 700.30 ± 415.67
CUMS 组	73.96 ± 13.13 ^{##}	2 291.13 ± 270.34 [#]
CUMS + 佐太 6.069 7 mg/kg 组	42.25 ± 6.04 ^{###}	2 859.64 ± 332.18 ^{***}
CUMS + 佐太 60.697 mg/kg 组	40.37 ± 7.00 ^{###}	2 843.19 ± 275.57 ^{**}
CUMS + 佐太 606.97 mg/kg 组	44.08 ± 5.44 ^{###}	2 649.49 ± 357.51 [*]
CUMS + 丙咪嗪 15 mg/kg 组	65.97 ± 5.26 [*]	2 668.40 ± 351.51 [*]

注: 与空白组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与 CUMS 组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

3.2.3 佐太对 CUMS 模型小鼠强迫游泳不动时间的影响
如图 3 所示, 与空白组相比, CUMS 组小鼠强迫游泳不动时间显著增加 ($P < 0.01$), 而给予 6.069 7、60.697、606.97 mg/kg 佐太和 15 mg/kg 丙咪嗪组小鼠与 CUMS 组相比, 其不动时间显著减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



注: 与空白组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与 CUMS 组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

图 3 佐太对 CUMS 模型小鼠强迫游泳不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Effect of Zuotai on immobility time in forced swimming test of CUMS mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.2.4 佐太对 CUMS 模型小鼠血清中 5-HT 和 NE 水平的影响
如表 4 所示, 与空白组相比, CUMS 组小鼠血清中 5-HT 和 NE 水平显著减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 CUMS 组相比, 6.069 7、60.697 mg/kg 佐太组和 15 mg/kg 丙咪嗪组小鼠血清中 5-HT 水平

显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 6.069 7、60.697、606.97 mg/kg 佐太组和 15 mg/kg 丙咪嗪组小鼠血清中 NE 水平显著上升 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。

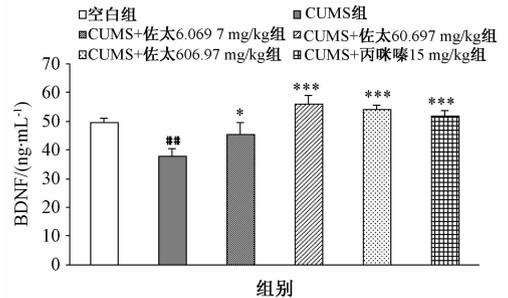
表 4 佐太对 CUMS 模型小鼠血清中 5-HT 和 NE 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 4 Effects of Zuotai on the levels of 5-HT and NE in serum of CUMS mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	5-HT/(ng·mL ⁻¹)	NE/(pg·mL ⁻¹)
空白组	191.38 ± 14.41	63.93 ± 17.01
CUMS 组	152.04 ± 11.12 ^{##}	47.69 ± 17.50 [#]
CUMS + 佐太 6.069 7 mg/kg 组	183.79 ± 22.63 [*]	63.84 ± 7.38 [*]
CUMS + 佐太 60.697 mg/kg 组	194.17 ± 23.69 ^{**}	64.48 ± 10.97 [*]
CUMS + 佐太 606.97 mg/kg 组	179.93 ± 35.14	78.97 ± 19.74 [#]
CUMS + 丙咪嗪 15 mg/kg 组	183.85 ± 22.95 [*]	65.72 ± 7.04 [*]

注: 与空白组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与 CUMS 组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

3.2.5 佐太对 CUMS 模型小鼠海马中 BDNF 水平的影响
如图 4 所示, 与空白组相比, CUMS 组小鼠海马中 BDNF 水平显著降低 ($P < 0.01$), 给予 6.069 7、60.697、606.97 mg/kg 佐太和 15 mg/kg 丙咪嗪组小鼠海马中 BDNF 水平与 CUMS 组相比显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。



注: 与空白组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与 CUMS 组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{***} $P < 0.001$

图 4 佐太对 CUMS 模型小鼠海马中 BDNF 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 4 Effect of Zuotai on BDNF expression in the hippocampus of CUMS mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

4 讨论

本研究在行为绝望模型—小鼠悬尾实验和不可预知慢性温和应激 (CUMS) 小鼠模型实验中发现, 佐太可以有效地缓解受试小鼠的抑郁样行为, 并且可以影响其下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴关键信号分子 (如 CORT)、单胺类递质 (如 5-HT、NE) 及脑源性神经营养因子。根据目前文献报道, 抑郁症的发病机制可能与 HPA 轴功能亢进, 单胺类神经递质 (如 5-HT、NE) 及海马脑源性神经营

养因子 (BDNF) 水平降低等密切相关。

悬尾实验作为一种行为绝望动物模型,是抗抑郁药物初筛的常用方法。动物在恶劣环境下,会出现逃逸行为,当不能逃逸时,便表现出一动不动状态即绝望行为^[13]。在小鼠悬尾实验中,给予14 d 60.697、303.49 mg/kg 佐太和15 mg/kg 丙咪嗪能够显著减少悬尾不动时间,即表现出一定的抗抑郁作用;给予14 d 6.069 7、60.697、303.49 mg/kg 佐太和15 mg/kg 丙咪嗪能够显著降低小鼠的自主活动,同时显著降低小鼠血清中CORT水平,表明佐太表现出的抗抑郁作用不是由于假阳性导致的,并且可能是通过降低CORT水平发挥作用。

CUMS模型被认为是动物水平研究抑郁症和模拟人类抑郁症状的最有价值 and 可信度的一类啮齿动物模型^[14]。Willner认为CUMS作为一种研究抑郁症神经生物学基础的理想模型,比一般的急性动物模型更加适合探究抗抑郁药物的作用机制^[15-16]。本次实验结果如同先前的文献报道一致,与空白组相比,CUMS组小鼠糖水偏好率显著降低,即产生快感缺乏症(anhedonia),这正是抑郁症的核心表现^[17-18],CUMS组糖水偏好率相对空白组降低的差值占空白组值的46.73%,而给予佐太和丙咪嗪后能够使小鼠快感缺乏症状恢复到正常水平。

开场实验是一种常用的啮齿类动物行为学实验,可以用来检测自发活动行为,评价小鼠对于新环境的响应行为。一些研究表明,长期慢性应激可以减少小鼠自发活动^[19]。在本次实验中,CUMS小鼠在开场实验中静止时间增加、运动距离减少,说明小鼠自主活动受到了显著抑制,而给予佐太和丙咪嗪后的小鼠静止时间显著减少、运动距离显著增加,表明佐太和丙咪嗪可以显著改善此种抑郁状态。

CUMS造模小鼠在强迫游泳实验中不动时间显著增加,其不动时间与空白组小鼠相比增加的差值占空白组值的59.79%,表明CUMS组小鼠绝望行为显著增加,而给予佐太和丙咪嗪可以缓解由CUMS引起的绝望行为,降低小鼠在强迫游泳实验中的不动时间,说明佐太和丙咪嗪能够显著减少CUMS引起的小鼠绝望行为。

目前,5-羟色胺(5-HT)和去甲肾上腺素(NE)能系统作为目前多数临床抗抑郁药的基础,现在仍然是评价抗抑郁成分的一种重要系统^[3]。临床治疗显示,随着抗抑郁药物的给予及抑郁症状的改善,5-HT或NE水平逐步增高^[20]。从本实验

中可以看出,CUMS造模后的小鼠血清中单胺类神经递质5-HT和NE水平显著降低,而给予一定剂量的佐太和丙咪嗪能够显著增加两者水平。结果表明,6.069 7、60.697 mg/kg 佐太可能是通过增加5-HT和NE水平产生抗抑郁作用,而606.97 mg/kg 佐太可能是通过增加NE水平产生抗抑郁作用,表明低剂量和高剂量佐太对于5-HT和NE的作用机制可能不相同。

BDNF能够影响突触结构的重塑,对维持神经元正常的生理功能起关键的作用^[21]。相关研究发现,抑郁症患者血清中BDNF水平显著低于正常对照者,而给予抗抑郁药、心境稳定剂和电痉挛等治疗后能提高血清中BDNF水平^[20-22]。另外有尸检结果表明,抑郁症患者海马中BDNF水平显著低于正常对照者^[23]。本研究结果表明,长期应激能够降低小鼠海马中BDNF水平,而给予佐太和丙咪嗪能够有效逆转这一现象。

本研究通过行为绝望模型—小鼠悬尾实验和不可预测性慢性温和应激(CUMS)模型小鼠实验,发现藏药佐太具有一定的抗抑郁作用,并且提示佐太的抗抑郁作用可能是通过降低HPA轴关键信号分子—CORT,提高单胺类神经递质5-HT、NE水平和海马中BDNF的水平来发挥作用。

参考文献:

- [1] 徐汉明,胡晓华. 抑郁症-治疗与研究[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:1-5.
- [2] World Health Organization. Mental disorders [EB/OL]. 2015-10. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs396/en/>.
- [3] Berton O, Nestler E J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(2): 137-151.
- [4] Lavin M R, Mendelowitz A, Block S H. Adverse reaction to high-dose fluoxetine[J]. *J Clin Psychopharm*, 1993, 13(6): 452-453.
- [5] 王智森,赵正平,赵献超,等. 基础藏药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2011:6-7.
- [6] Zhao X Y, Sun M, Wang J X, et al. Characterization of tibetan medicine zuota by multiple techniques[J]. *Bioinorg Chem Appl*, 2013, 2013: 198545.
- [7] 看召本. 透视藏医珍宝类药品中的“佐太”[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(10): 1621-1623.
- [8] 曾勇,何毓敏,刘颖,等. 藏药“佐塔”对中枢神经系统的部分药理作用研究[J]. 四川中医, 2005, 23(11): 36-37.
- [9] Crawley J N. What's wrong with my mouse?: behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice[M]. New York: John

- Wiley & Sons, 2007; 248-251.
- [10] Choleris E, Thomas A W, Kavaliers M, *et al.* A detailed ethological analysis of the mouse open field test; effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001, 25(3): 235-260.
- [11] Mao Q Q, Ip S P, Ko K M, *et al.* Peony glycosides produce antidepressant-like action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress; effects on hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain-derived neurotrophic factor[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33(7): 1211-1216.
- [12] 吴俊芳, 刘 恣. 现代神经科学研究方法[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2006; 982-983.
- [13] Gould, Todd D. Mood and anxiety related phenotypes in mice; characterization using behavioral tests [M]. New York; Humana Press, 2009; 119-176.
- [14] Muscat R, Willner P. Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1992, 16(4): 507-517.
- [15] Willner P, Towell A, Sampson D, *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology*, 1987, 93(3): 358-364.
- [16] Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia; a realistic animal model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1992, 16(4): 525-534.
- [17] Rygula R, Abumaria N, Domenici E, *et al.* Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2006, 174(1): 188-192.
- [18] Monleon S, Parra A, Simon V M, *et al.* Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine [J]. *Psychopharmacology*, 1995, 117(4): 453-457.
- [19] Dang H, Chen Y, Liu X, *et al.* Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33(8): 1417-1424.
- [20] Krishnan V, Nestler E J. The molecular neurobiology of depression[J]. *Nature*, 2008, 455(7215): 894-902.
- [21] Karege F, Vaudan G, Schwald M, *et al.* Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs [J]. *Mol Brain Res*, 2005, 136(1): 29-37.
- [22] Duman R S, Monteggia L M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders [J]. *Biol Psychiat*, 2006, 59(12): 1116-1127.
- [23] Preskorn S H, Feighner J P, Stanga C Y, *et al.* Antidepressants: past, present and future[M]. Berlin: Springer Science and Business Media, 2004; 171-324.