

五合天参枣汤抗抑郁作用的初步探究

张磊阳, 贺敏, 陈文文, 赵文芳, 蒋健*
(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

摘要: **目的** 初步探讨五合天参枣汤的抗抑郁作用。**方法** 通过对小鼠连续灌胃 15 d 后进行悬尾实验和强迫游泳实验, 建立小鼠行为绝望模型, 观察各组小鼠悬尾不动时间和游泳不动时间; 通过对大鼠进行孤养加慢性不可预知温和刺激建立大鼠慢性不可预知温和应激模型 (chronic unpredictable mild stress, CUMS), 以糖水偏好实验和强迫游泳实验对各组大鼠进行行为学测试。采用 ELISA 法分别测定 CUMS 大鼠血清 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 和皮质酮 (corticosterone, CORT) 水平。**结果** 五合天参枣汤可缩短小鼠悬尾不动时间及游泳不动时间 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。CUMS 大鼠糖水偏好度降低、游泳不动时间延长 ($P < 0.05$), 给予五合天参枣汤后, 糖水偏好度增加、游泳不动时间缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。CUMS 大鼠血清 5-HT 水平降低、CORT 水平升高 ($P < 0.01$), 给予五合天参枣汤后, 血清 5-HT 水平升高、CORT 水平降低 ($P < 0.01$)。**结论** 五合天参枣汤具有一定的抗抑郁作用, 可能与调节 5-HT 和 CORT 的水平有关。

关键词: 抑郁症; 五合天参枣汤; 行为绝望模型; CUMS; 5-HT; CORT

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)05-1315-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.05.040

抑郁症是一种常见的精神障碍性疾病, 截至 2015 年占全球总人口 4.4% 的人群患有抑郁症, 且女性患者多于男性患者, 以老年患者居多, 从 2005 到 2015 年全球抑郁症患者增加了 18.4%^[1]。抑郁症属中医情志类疾病范畴, 祖国医学千年之前对情志类疾病已有一定的认识。蒋健教授根据中医理论并结合临床体会^[2-4]认为, 抑郁日久, 耗伤气血, 虚而心神不安, 可采用解郁、补虚、安神之法, 参考历代医家的文献, 结合现代药理研究^[5-6], 经过临床反复摸索与验证, 提炼出治疗抑郁症的五合天参枣汤, 由党参、刺五加、酸枣仁、合欢花、合欢皮、五味子、红景天组成。

1 材料与方法

1.1 动物 ICR 小鼠, 雄性, SPF 级, 84 只, 体质量 (20±2) g; Wistar 大鼠, 雄性, 清洁级, 体质量 160~180 g, 100 只, 均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 生产许可证号 SCXK (沪) 2017-0016, 动物均在上海中医药大学实验动物中心进行饲养, 适应性喂养 1 周后用于实验。

1.2 药物 五合天参枣汤每剂含五味子 (批号 1704193) 6 g、合欢花 (批号 1511027) 10 g、合欢皮 (批号 1611008) 12 g、红景天 (批号 1609018) 6 g、酸枣仁 (批号 1611086) 15 g、党参 (批号 1705092) 30 g、刺五加 (批号 1702176) 27 g; 归脾汤; 木香 (批号 1612110)、远

志 (批号 1604042)、白术 (批号 1705141)、党参 (批号 1705092)、茯神 (批号 1612055)、当归 (批号 1704210)、黄芪 (批号 1611029)、龙眼肉 (批号 1702069)、酸枣仁 (批号 1611086)、甘草 (批号 1704035); 柴胡疏肝散: 柴胡 (批号 1704093)、陈皮 (批号 1702192)、川芎 (批号 1511120)、香附 (批号 1703104)、枳壳 (批号 1701005)、芍药 (批号 1705169)、甘草 (批号 1704035)。中药均为配方颗粒, 购自江阴天江药业有限公司。盐酸氟西汀胶囊 (批号 6603A), 购自礼来苏州制药有限公司, 每粒含氟西汀 20 mg, 用蒸馏水配成浓度为 2 mg/mL 的药液^[7-8]。

1.3 试剂与仪器 悬尾箱 (20 cm×25 cm×30 cm) 自制; 透明有机玻璃圆柱桶 (30 cm×15 cm); 透明有机玻璃圆柱桶 (45 cm×20 cm)。5427R 小型离心机 (德国 Eppendorf 公司); Avanti J-E 立式离心机 (美国 BECKMAN 公司); XMJD-8222 恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司); THZ-C 恒温振荡器 (江苏太仓实验设备厂); MQX200R 微孔板扫描分光光度计 (美国 BioTek 公司); F200 PRO 荧光酶标仪 (瑞士 TECAN 公司)。蔗糖, 分析纯 (批号 V900116-500G) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; Serotonin ELISA^{Fast Track} (批号 BA E-8900) 购自德国 LDN 公司; Corticosterone rat/mouse ELISA (批号 AR E-8100) 购自德国 LDN 公司。

收稿日期: 2020-05-29

基金项目: 国家科技部“十三五”重大新药创制项目 (2017ZX09304002); 上海市教委重点学科中药临床药理学 (J50303); 上海市名老中医学术经验工作室建设项目 (SHGZS2017024)

作者简介: 张磊阳 (1991—), 女, 硕士, 从事中医内科郁证的临床及实验研究。Tel: 13122264285, E-mail: zlyash123@163.com

* **通信作者:** 蒋健 (1956—), 男, 医学博士, 主任医师, 教授, 从事中医内科临床以及疗效评价、郁证研究。Tel: 13918104069, E-mail: jiangjiansg@126.com

1.4 模型制备

1.4.1 行为绝望模型

1.4.1.1 小鼠悬尾实验 于末次给药前禁食不禁水 12 h, 末次给药 40 min 后将小鼠尾部 2 cm 处用黏膏条固定在悬尾箱内, 其头部距离台面大约 5 cm, 共计观察小鼠 6 min, 适应 2 min 后, 记录后 4 min 的累计不动时间, 小鼠不动的判断标准为小鼠停止挣扎, 身体呈倒悬状态, 静止不动, 每做完一只, 用 75% 的酒精喷洒悬尾箱内部。

1.4.1.2 小鼠强迫游泳实验 于末次给药前禁食不禁水 12 h, 末次给药 40 min 后将小鼠放入盛水的透明玻璃缸水温 (25±1)℃ 中, 记录 6 min 内后 4 min 的不动时间, 小鼠游泳不动的判断准则为小鼠停止挣扎, 在水面呈漂浮状态, 仅有微小的肢体运动以保持头部浮在水面上, 实验期间及时更换水。

1.4.2 慢性不可预知温和应激模型

1.4.2.1 造模方法 采用孤养加 CUMS 的方法进行造模, 空白对照组与造模组的大鼠放在不同饲养室, 保证两组大鼠相互不受影响。空白对照组正常饲养, 不给予任何刺激, 保证其正常的饮食、饮水。造模组采取孤养且给予连续的 CUMS, 具体应激有禁食 24 h, 禁水 24 h, 空瓶 1 h, 潮湿垫料 24 h, 倾斜饲养 (约 45 °, 在禁水禁食后进行), 闪光灯 3 h (同时关闭屋内照明灯), 噪音 3 h, 悬尾 10 min, 4 ° 冷水游泳 5 min, 45 ° 热水游泳 5 min, 昼夜颠倒, 拥挤饲养 4 h, 成对饲养 4 h, 束缚 2 h, 夹尾 1 min。不同的应激刺激因素 (不间断, 白天和晚上均有) 每天随机给予 1~2 种应激, 每种应激不重复出现。共造模 28 d。除空白对照组外, 其他各组给药期间继续给予应激。

1.4.2.2 行为学测试

1.4.2.2.1 糖水偏好实验 以糖水偏好实验作为 CUMS 模型造模成功的评价方法。将大鼠适应性饲养一周, 期间对大鼠进行 3 次糖水训练, 后进行糖水偏好实验, 第 1 个 24 h 每笼放置 2 瓶糖水 (1% 蔗糖水); 第 2 个 24 h 换为 1 瓶糖水, 一瓶正常饮用水, 第 2 天下午 4 点禁水至第 3 天上午 10 点, 共 18 h, 18 h 后开始测糖水消耗。给每只大鼠随机放置 2 个水瓶, 饮水瓶规格相同, 放置的高度一致, 分别放有事先称定质量的现配的 1% 蔗糖水和正常饮用水, 6 h 后取 2 瓶再次称定质量。记录每只大鼠的糖水和正常饮用水消耗量, 计算糖水偏好度 = 蔗糖水消耗 / (蔗糖水消耗 + 正常水消耗) × 100%。造模前测 1 次, 造模期间每周均测。

1.4.2.2.2 大鼠强迫游泳实验 各组大鼠末次给药 1 h 后进行实验, 将大鼠置于高 45 cm, 直径 20 cm 的圆柱形有机玻璃缸中, 其中放入 (25±2) ° 的水, 高度 30 cm, 每次只放 1 只, 记录大鼠的游泳行为 5 min, 并分析 5 min 内大鼠强迫游泳的累计不动时间。判断大鼠不动的标准为大鼠在水中停止挣扎, 呈漂浮状态, 仅有小幅度的肢体运动以保持头部浮在水面上。实验期间及时更换水。

1.5 分组及给药

ICR 小鼠适应性喂养后, 据体质量进行

分层随机分组, 分为空白对照组、氟西汀组 (20 mg/kg)、柴胡疏肝散组 (9.29 g/kg)、归脾汤组 (8.83 g/kg)、五合天参枣汤低剂量组 (7.57 g/kg)、中剂量组 (15.14 g/kg) 和高剂量组 (30.29 g/kg), 每组 10 只, 各组连续灌胃给药 15 d, 空白对照组予同容量的蒸馏水, 灌胃容量为 0.1 mL/10 g, 末次给药后进行悬尾实验和强迫游泳实验。

Wistar 大鼠适应性喂养后, 根据糖水偏好实验, 剔除对糖水无偏好及糖水偏好度低的大鼠, 从中随机选出 10 只设为空白对照组, 对剩余大鼠进行造模, 以大鼠糖水偏好实验确定造模成功后, 按照随机数字表法对造模成功的大鼠进行随机分组, 分为大鼠模型组、氟西汀组 (10 mg/kg)、柴胡疏肝散组 (6.5 g/kg)、归脾汤组 (5.3 g/kg)、五合天参枣汤低剂量组 (5.3 g/kg)、中剂量组 (10.6 g/kg)、高剂量组 (21.2 g/kg), 每组 10 只, 各组连续灌胃给药 21 d, 空白对照组及模型组给予同量的蒸馏水, 灌胃量为 0.5 mL/100 g。

1.6 血清 5-HT、CORT 水平检测 在 CUMS 大鼠末次给药前禁食不禁水 12 h, 末次给药后, 麻醉, 腹主动脉采血, 室温静置 2 h 后离心 (3 000 r/min, 10 min), 离心后吸取上清分装, -80 ° 冻存, 待用。血清 5-HT、CORT 水平检测按照试剂盒说明操作。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件对数据库资料进行统计, 计量资料均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。计量资料满足正态性、方差齐性时采用 *t* 检验 (两组间比较) 或方差分析 (多组间比较), 方差不齐则采用 Dunnett's-T3 进行两两比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 五合天参枣汤对行为绝望小鼠模型不动时间的影响 如表 1 所示, 与空白对照组比较, 五合天参枣汤低剂量组、氟西汀组和柴胡疏肝散组的小鼠悬尾不动时间均缩短 (P < 0.05)。与空白对照组比较, 五合天参枣汤低剂量组和氟西汀组的小鼠游泳不动时间缩短 (P < 0.01), 柴胡疏肝散组、归脾汤组、五合天参枣汤高剂量组和中剂量组的小鼠游泳不动时间均缩短 (P < 0.05)。

表 1 五合天参枣汤对行为绝望小鼠模型不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	悬尾不动 时间/s	游泳不动 时间/s
空白对照组	—	111.78±37.70	157.00±39.40
氟西汀组	0.02	67.08±24.70*	101.50±6.80**
柴胡舒肝散组	9.29	69.00±42.00*	120.40±28.20*
归脾汤组	8.83	96.90±49.44	122.80±35.50*
五合天参枣汤高剂量组	30.29	106.67±54.91	121.90±38.30*
五合天参枣汤中剂量组	15.14	103.33±44.23	120.50±46.70*
五合天参枣汤低剂量组	7.57	68.67±32.34*	106.00±34.80**

注: 与空白对照组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01。

2.2 五合天参枣汤对 CUMS 大鼠糖水偏好度的影响及大鼠游泳不动时间的影响 造模后 7 d, 与空白对照组比较, 造模组糖水偏好度降低 (P < 0.05), 提示造模成功。见表 2,

造模7 d后,与空白对照组比较,此7组糖水偏好度降低 ($P<0.05$);与造模前比较,此7组糖水偏好度降低 ($P<0.05$),提示造模成功,分组合理。

表2 各组建模前后的糖水偏好度 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ ($g\cdot kg^{-1}$)	造模前/%	造模7 d/%
空白对照组	—	88.50±7.20	90.10±11.20
模型组	—	89.30±5.60	72.20±22.60 ^{**}
氟西汀组	0.01	87.50±6.10	72.70±20.20 ^{**}
柴胡舒肝散组	6.50	85.60±7.40	68.60±29.60 ^{**}
归脾汤组	5.30	89.60±5.50	70.80±25.50 ^{**}
五合天参枣汤高剂量组	21.20	90.10±5.10	74.40±19.80 ^{**}
五合天参枣汤中剂量组	10.60	87.50±7.50	72.30±19.50 ^{**}
五合天参枣汤低剂量组	5.30	85.70±7.90	70.20±20.10 ^{**}

注:与空白对照组比较,^{*} $P<0.05$;与造模前比较,[#] $P<0.05$ 。

表3 五合天参枣汤对 CUMS 大鼠糖水偏好度的影响及大鼠游泳不动时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/($g\cdot kg^{-1}$)	糖水偏好度给药前/%	糖水偏好度给药21 d/%	不动时间/s
空白对照组	—	90.10±11.20	91.60±7.90	97.70±11.95
模型组	—	72.20±22.60	71.40±13.10 ^{##}	138.33±28.34 [#]
氟西汀组	0.01	72.70±20.20	90.60±9.60 ^{*△△}	56.5±16.55 ^{△△##}
柴胡舒肝散组	6.50	62.10±28.90	87.30±16.40 ^{*△}	81.88±24.37 [△]
归脾汤组	5.30	70.80±25.50	74.80±18.80 ^{##}	89.50±29.61
五合天参枣汤高剂量组	21.20	74.40±19.80	91.00±7.30 ^{△△}	109.43±24.10
五合天参枣汤中剂量组	10.60	72.30±19.50	86.90±16.0 ^{△△}	65.44±48.46 [△]
五合天参枣汤低剂量组	5.30	70.20±20.10	89.40±11.40 ^{*△△}	75.80±36.09 [△]

注:与给药前比较,^{*} $P<0.05$;与空白对照组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

2.3 五合天参枣汤对 CUMS 大鼠血清 5-HT、CORT 水平影响 如表4所示,与空白对照组比较,模型组大鼠血清 5-HT 水平降低 ($P<0.01$),氟西汀组大鼠血清 5-HT 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,空白对照组、五合天参枣汤组和氟西汀组大鼠血清 5-HT 水平均升高 ($P<0.01$)。与空白对照组比较,模型组大鼠血清 CORT 水平升高 ($P<0.01$),与模型组比较,空白组对照组、五合天参枣汤组和氟西汀组大鼠血清 CORT 的水平均降低 ($P<0.01$)。

表4 五合天参枣汤对 CUMS 大鼠血清 5-HT、CORT 水平影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ ($g\cdot kg^{-1}$)	5-HT/ ($ng\cdot mL^{-1}$)	CORT/ ($ng\cdot mL^{-1}$)
空白对照组	—	24.21±10.89	134.74±35.11
模型组	—	7.04±4.11 ^{**}	379.07±91.55 ^{**}
氟西汀组	0.01	57.18±8.90 ^{**##}	206.74±65.29 ^{##}
五合天参枣汤组	5.30	26.26±9.39 ^{##}	197.56±77.36 ^{##}

注:与空白对照组,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

3 讨论

中医郁证(相当于抑郁症)主要为情志因素而引起,发病与肝的关系最为密切,其次是心脾。以气机郁滞为基本病变,以肝失疏泄、脾失健运、心失所养、脏腑阴阳气血失调为主要病机。该方以党参、刺五加合用达补虚安神之效,共为君药,酸枣仁、合欢花、合欢皮为臣药共奏解郁安神之功,五味子、红景天为佐药与君臣配伍,补虚是使神有安养、解郁使神得以条畅,共奏补虚解郁安神之功。

如表3所示,给药第21天后,与给药前比较,氟西汀组、五合天参枣汤低剂量组和柴胡疏肝散组的糖水偏好度增加 ($P<0.05$);五合天参枣汤中、高剂量组的糖水偏好度有增加的趋势。给药21 d后,与空白对照组比较,模型组、归脾汤组的糖水偏好度降低 ($P<0.01$);与模型组比较,空白对照组、氟西汀组和五合天参枣汤低、中、高剂量组的糖水偏好度增加 ($P<0.01$),柴胡舒肝散组的糖水偏好度增加 ($P<0.05$)。给药21 d后,与空白对照组比较,氟西汀组的大鼠游泳不动时间缩短 ($P<0.01$),模型组的大鼠游泳不动时间延长 ($P<0.05$);与模型组比较,氟西汀组的大鼠游泳不动时间缩短 ($P<0.01$),五合天参枣汤中、低剂量组、柴胡舒肝散组和空白对照组的大鼠游泳不动时间均缩短 ($P<0.05$),五合天参枣汤高剂量组和归脾汤组的大鼠游泳不动时间有缩短的趋势。

表3 五合天参枣汤对 CUMS 大鼠糖水偏好度的影响及大鼠游泳不动时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

由于中药成分复杂,动物整体实验可以为研究该方提供更多可靠的信息。选择合适的动物模型在抗抑郁作用的药理研究中尤为重要。行为绝望模型包括悬尾模型和强迫游泳模型,主要以动物的不动时间为评价绝望或抑郁状态的指标,具有好的预测效度,能简单、快速的对具有抗抑郁潜能的药物进行药效初筛^[9]。CUMS模型是将大鼠或小鼠长期置于持续的不可预知的温和刺激环境中,从而诱导出抑郁相关的行为^[10]。该模型主要以动物对蔗糖水的消耗量为指标,遭受慢性应激刺激的大鼠会出现蔗糖水饮用量下降的现象,该症状反映了抑郁症的核心症状快感缺失^[11]。研究表明该模型不但可以诱导持久的快感缺乏,还可以使动物记忆受损、社交能力下降、体质量减轻、CORT分泌增多、5-HT再摄取增多^[12]等,这些改变均与临床抑郁症状发病机制相似。故本实验选择小鼠行为绝望模型对五合天参枣汤的抗抑郁作用进行初步的药效学筛查,选择CUMS模型对五合天参枣汤的抗抑郁作用进行确证并进行部分作用机理的初步探讨。柴胡舒肝散作为疏肝解郁的代表方,归脾汤具有补益心脾之效,二者皆为临床治疗抑郁症常用方,多项研究^[13-15]亦表明二者的抗抑郁作用,五合天参枣汤具有解郁补虚安神之功,又与二者主治功效相似,故将二者选为本实验中阳性对照药。本研究结果表明,五合天参枣汤和柴胡疏肝散均可缩短行为绝望小鼠模型的游泳不动时间和悬尾不动时间,归脾汤能缩短小鼠游泳不动时间,与Porsolt^[16]的研究一致,提示五合天参枣汤具有一定的抗抑郁作用。CUMS模型大鼠表现出明显的糖水偏

爱度降低, 游泳不动时间延长, 动物的这些表现与该模型最初的研制者 Willner^[17]的实验结果一致, 提示 CUMS 使大鼠产生抑郁症状, 导致其行为学指标异常, 造模成功。五合天参枣汤和柴胡疏肝散能缩短 CUMS 大鼠模型的游泳不动时间, 提高 CUMS 大鼠模型的糖水偏爱度, 提示五合天参枣汤具有一定的抗抑郁的作用。本实验研究亦提示五合天参枣汤和柴胡疏肝散的药效学研究未有明显差异, 二者均具有一定的抗抑郁作用; 而归脾汤未呈现出一定的药效学结果, 可能与本实验中该方的剂量设置有关。

中药治疗抑郁症大多通过多靶点、多环节起效, 不同的中药作用的机制也不尽相同, 本实验主要对五合天参枣汤抗抑郁作用机制进行初步的研究。抑郁症与 5-HT 能系统的改变有密切关系, 5-HT 含量的减少, 增加了患抑郁症的风险。研究表明抑郁患者血小板中 5-HT 水平降低, 血浆中 5-HT 的前体物质 L-色氨酸的水平也降低^[18]。Bianchi 等^[19]通过研究说明外周血中的 5-HT 水平能够反映抑郁时中枢 5-HT 的变化情况。本实验研究结果表明, CUMS 模型大鼠血清中 5-HT 含量水平下降, 经过五合天参枣汤的治疗, 大鼠血清中 5-HT 水平恢复到正常水平, 提示五合天参枣汤的抗抑郁作用可能与调节 5-HT 水平有关。

HPA 轴是经典的神经内分泌系统, 是处理应激的关键因素, 大量研究表明抑郁症患者的 HPA 轴活性升高^[20-21]。HPA 轴最终合成和分泌糖皮质激素。研究表明 CUMS 模型能显著增加血清中 CORT 浓度^[22], 血清中 CORT 浓度升高也是 HPA 轴亢进的一种外在表现。在给予抗抑郁药物治疗后, CORT 水平恢复正常。故在本研究中选取血清 CORT 作为一项检测指标。本实验研究结果表明, CUMS 模型大鼠血清中 CORT 含量水平升高, 给予五合天参枣汤治疗后, 大鼠血清中的 CORT 恢复到正常水平。提示五合天参枣汤的抗抑郁作用可能与调节 CORT 水平有关。

在本研究结果中表明五合天参枣汤低剂量的抗抑郁作用最佳, 可能是因为中药的成分复杂, 不同成分对同一效应可能出现不同或相反的作用, 从而会打乱剂量与效应间的平行关系而失去规律性, 亦或提示今后的研究中应深入量效关系的研究。

参考文献:

[1] Mathers C D, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030[J]. *PLoS Med*, 2006, 3(11): 2011-2029.

[2] 蒋 健. 郁证发微(一) 郁证形态论[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(8): 4-7.

[3] 蒋 健. 郁证发微(二十一) 郁证疲劳论[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(4): 10-15.

[4] 蒋 健. 郁证发微(十八) 郁证虚劳论[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(1): 8-12.

[5] 张磊阳, 蒋 健, 贺 敏, 等. 抗抑郁中药的药理研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 224-234.

[6] 李 玥, 贺 敏, 张磊阳, 等. 抗抑郁药物的研究进展[J]. 临床药物治疗杂志, 2017, 15(1): 8-13.

[7] Du H, Wang K, Su L, et al. Metabonomic identification of the effects of the Zhimu-Baihe saponins on a chronic unpredictable mild stress-induced rat model of depression [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 128: 469-479.

[8] Strober M, DeAntonio M, Schmidt-Lackner S. The pharmacotherapy of depressive illness in adolescents: an open-label comparison of fluoxetine with imipramine-treated historical controls[J]. *J Clin Psychiatry*, 1999, 60(3): 164-169.

[9] Castagné V, Moser P, Roux S, et al. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice[J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2011, doi: 10.1002/0471142301.

[10] 张磊阳, 贺 敏, 李 玥, 等. 抑郁症动物模型的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 9(27): 92-97.

[11] 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.

[12] Cai L, Li R, Tang W J, et al. Antidepressant-like effect of geniposide on chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats by regulating the hypothalamus-pituitary-adrenal axis [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2015, 25(8): 1332-1341.

[13] 邓 颖, 张春虎, 张海男, 等. 柴胡疏肝散及其拆方对抑郁模型大鼠行为及海马、杏仁核、额叶 BDNF 及其受体 TrkB 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(10): 1373-1378.

[14] 朱晨军, 李 侠, 曲 森. 归脾汤治疗心脾两虚型抑郁症 30 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 209-213.

[15] 董介正, 李秀荣, 邱龄山, 等. 归脾汤联合氟西汀对抑郁模型大鼠行为学及海马区 NE、5-HT 及 DA 的影响研究[J]. 中药材, 2017, 40(2): 457-461.

[16] Porsolt R D, Brossard G, Hautbois C, et al. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice[J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2001, doi: 10.1002/0471142301.

[17] Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1997, 134(4): 319-329.

[18] Fakhoury M. Revisiting the Serotonin Hypothesis: Implications for Major Depressive Disorders[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(5): 2778-2786.

[19] Bianchi M, Moser C, Lazzarini C, et al. Forced swimming test and fluoxetine treatment: *in vivo* evidence that peripheral 5-HT in rat platelet-rich plasma mirrors cerebral extracellular 5-HT levels, whilst 5-HT in isolated platelets mirrors neuronal 5-HT changes[J]. *Exp Brain Res*, 2002, 143(2): 191-197.

[20] Stetler C, Miller G E. Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research[J]. *Psychosom Med*, 2011, 73(2): 114-126.

[21] Zunszain P A, Anacker C, Cattaneo A, et al. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2011, 35(3): 722-729.

- [22] Ayub N N, Firgany A E L, El-Mansy A A, et al. Can Ocimum basilicum relieve chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice? [J]. *Exp Mol Pathol*, 2017, 103 (2): 153-161.

沙棘熊果酸调控 NLRP3/caspase-1 轴在抗结核药物致人肝细胞损伤中的作用

窦增花¹, 于国英²

(1. 青海省第四人民医院, 青海 西宁 810000; 2. 青海省第四人民医院肝病科, 青海 西宁 810000)

摘要:目的 探究沙棘熊果酸调控 NLRP3/caspase-1 轴在抗结核药物致人肝细胞损伤中的作用。方法 正常肝细胞株 HL-7702 分正常组、模型组及沙棘熊果酸低、中、高浓度组。除正常组外, 其余各组 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 异烟肼和 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平联合处理构建抗结核药物致人肝细胞损伤模型, 沙棘熊果酸低、中、高浓度组同时添加 0.018、0.18、1.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 沙棘熊果酸共培养。CCK-8 法检测细胞增殖能力; ELISA 检测上清液中 TNF- α 、白 IL-1 β 水平; SOD 活性检测试剂盒、MDA 检测试剂盒检测上清液中 SOD、MDA 水平; 流式细胞术检测细胞凋亡能力; 蛋白免疫印迹检测细胞中 NLRP3、pro-caspase-1、caspase-1 (p10) 蛋白水平。**结果** 与正常组比较, 模型组 (12、24、36 h) 细胞存活率、上清液中 SOD 水平降低 ($P < 0.05$); 上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平, 细胞凋亡率, 细胞中 NLRP3、pro-caspase-1、caspase-1 (p10) 蛋白水平升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 沙棘熊果酸低、中浓度组 (24、36 h)、沙棘熊果酸高浓度组 (12、24、36 h) 细胞存活率, 沙棘熊果酸低、中、高浓度组上清液中 SOD 水平升高 ($P < 0.05$); 沙棘熊果酸低、中、高浓度组上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、凋亡率、细胞中 NLRP3 蛋白水平, 沙棘熊果酸中、高浓度组上清液中 MDA, 细胞中 pro-caspase-1、caspase-1 (p10) 蛋白水平降低 ($P < 0.05$)。随着沙棘熊果酸浓度的升高, (12、24、36 h) 细胞存活率、上清液中 SOD 水平逐渐升高 ($P < 0.05$); 上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、MDA、凋亡率, 细胞中 NLRP3、pro-caspase-1、caspase-1 (p10) 蛋白水平逐渐降低 ($P < 0.05$), 呈浓度依赖效应。**结论** 沙棘熊果酸在抗结核药物致人肝细胞中抑制 NLRP3/caspase-1 通路从而抑制炎症和氧化应激, 抑制细胞病变发生, 从而促进细胞增殖、抑制细胞凋亡, 实现对肝细胞的保护。

关键词: 沙棘熊果酸; 肝细胞损伤; 抗结核药物; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)05-1319-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.05.041

结核病是一种慢性传染病, 目前世界卫生组织推荐使用异烟肼和利福平联合治疗, 但造成的人肝细胞损伤是并发症之一^[1]。肝细胞损伤会降低肝细胞活力、导致细胞凋亡, 从而引发疾病^[2]。减缓肝损伤可有助于结核病的治疗, 沙棘具有抗炎、抗肥胖作用, 可明显修复损伤的肝细胞^[3], 沙棘中熊果酸具有抗炎、抗菌、抗凋亡等作用从而保护细胞^[4-5]。但沙棘熊果酸在抗结核药物致人肝细胞损伤中的作用却未发现相关研究。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) /半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteine-containing aspartate-specific-3 proteases-1, caspase-1) 炎症信号通路在肝损伤模型中表达上调, 可能参与肝细胞损伤过程, 是引发炎症反应的重要因素^[6]。本研究建立抗结核药物致人肝细胞损伤模型, 探究沙棘熊果酸对肝

细胞损伤的保护作用, 并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞 正常人肝细胞株 HL-7702 (中国科学院细胞库, 目录号 GNHu6)。

1.2 药物、试剂及仪器 沙棘果采摘于新疆维吾尔自治区昌吉回族自治州, 经青海省第四人民医院分离并提纯, 鉴定沙棘熊果酸使用红外光谱、高效液相色谱、核磁共振联合鉴定, 纯度 94.2%。异烟肼购自上海信谊药厂有限公司, 国药准字 H31020494; 利福平购自山西云鹏制药有限公司, 国药准字 H34022401; CCK-8 试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒、丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒均购自碧云天生物科技有限公司, 货号分别为 C0037、S0103、S0131、C1062S; 人肿瘤坏死因子- α

收稿日期: 2020-02-25

基金项目: 2017 年青海省卫生计生重点课题 (2017-wjzd-04)

作者简介: 窦增花 (1978—), 女, 副主任医师, 从事药物药理作用研究。Tel: 15297135672, Email: silence0531@163.com