

二苯乙烯苷在小鼠行为模型上的抗抑郁作用

吴晓青^{*}, 童妍, 马超英, 耿耘, 蒋合众
(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

[摘要] 目的:探讨 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷(THSG)的抗抑郁作用及其机制。方法:雄性昆明种小鼠随机分为空白对照组,盐酸氟西汀组(5 mg·kg⁻¹)和 THSG 组(200,100,50 mg·kg⁻¹),连续 ig 给药 7 d 后,进行小鼠悬尾试验(TST)和小鼠强迫性游泳试验(FST);除空白对照组外,各组连续 ig 给药 7 d 后,分别 ip 利血平(1 mg·kg⁻¹),观察 THSG 对利血平所致小鼠眼睑下垂和体温下降的拮抗作用。结果:在小鼠悬尾试验和小鼠强迫性游泳试验中,THSG 高、中剂量(200,100 mg·kg⁻¹)均能明显缩短小鼠在悬尾实验和强迫游泳实验中的不动时间($P < 0.01$)。在利血平诱导小鼠抑郁试验中,THSG 高、中剂量(200,100 mg·kg⁻¹)均能显著对抗利血平诱导的小鼠体温下降和眼睑下垂($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论:THSG 具有明显的抗抑郁作用,其作用机制可能与单胺递质有关。

[关键词] 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷; 抗抑郁; 强迫游泳; 利血平

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)14-0190-04

[doi] 10.11653/syjf2013140190

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130514.1002.006.html>

[网络出版时间] 2013-05-14 10:02

[收稿日期] 20121022(026)

[基金项目] 成都市成都市科技攻关计划(10GGYB172SW-023)

[通讯作者] ^{*} 吴晓青,副教授,从事中药物质基础及作用机制研究, E-mail:Wuxqlily@tom.com

[2] Min S S, Quan H Y, Ma J, et al. Chronic brain inflammation impairs two forms of long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 area [J]. Neurosci Lett, 2009, 456(1) : 20.

[3] 窦维华,徐姗姗.桂枝加葛根汤化裁治疗老年痴呆症 [J]. 四川中医, 2010, 28(5) : 75.

[4] 马麟,赵玉堂.桂枝加葛根汤抗炎镇痛作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7) : 249.

[5] Niccolò Terrando, Claudia Monaco, Daqing Ma, et al. Tumor necrosis factor- α triggers a cytokine cascade yielding postoperative cognitive decline [J]. PNAS, 2010, 107(47) : 20518.

[6] Julio Licinio, Ma-Li Wong. Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system [J]. J Clinical Invest, 1997, 100(12) : 2941.

[7] Lee J W, Lee Y K, Yuk D Y, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation [J]. J Neuroinflammation, 2008, 5 : 37.

[8] Wang Q, Rowan M J, Anwyl R. Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide [J]. J Neurosci, 2004, 24(27) : 6049.

[9] Hwang H, Jeon H, Ock J, et al. 2'-hydroxy-cinnamaldehyde targets low-density lipoprotein receptor-related protein-1 to inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation [J]. J Neuroimmunol, 2011, 230(1/2) : 52.

[10] Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, et al. The promise of slow down ageing may come from curcumin [J]. Curr Pharm Des, 2010, 16(7) : 884.

[11] Zhong Shuzhi, Ge Qing Hua, Li Qiao, et al. Peoniflorin attenuates $A\beta_{(1-42)}$ mediated neurotoxicity by regulating calcium homeostasis and ameliorating oxidative stress in hippocampus of rats [J]. J Neurol Sci, 2009, 280(1/2) : 71.

[责任编辑 聂淑琴]

Study on Anti-depressant Effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- β -D-glucoside

WU Xiao-qing*, TONG Yan, MA Chao-ying, GENG Yun, JIANG He-zhong

(College of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antidepressant effect and the possible mechanism of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG) in animal model. **Method:** Male KM mice were randomly divided into 5 groups: control group (normal saline), fluoxetine group (5 mg·kg⁻¹), THSG groups (200, 100, 50 mg·kg⁻¹). After oral administration for 7 days, the tail-suspending test (TST), the forced swimming test (FST) and reserpine-antagonism test were carried out to evaluate the antidepressant effects of THSG. In particular, reserpine (1 mg·kg⁻¹) was given by intraperitoneal injection before the reserpine-antagonism test. **Result:** Compared with the control group, the immobility time of TST and FST was shortened in THSG high, and middle, dose group ($P < 0.01$). Compared with the model group, THSG high, middle, dose group could significantly reverse the ptosis, and decrease body temperature induced by reserpine in mice ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** THSG has significant antidepressant effect, and its mechanism may be related to monoamine neurotransmitters.

[Key words] 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- β -D-glucoside; antidepressant effects; forced swimming test; reserpine

抑郁症是以情绪低落,言语减少,行为迟缓、及自罪自责等情感障碍为主要特征的一种常见病,目前的抗抑郁药物只能缓解部分症状,毒副作用较多,因此研究开发疗效好、毒副作用少的抗抑郁新药成为近年来研究的热点。目前已经建立了许多抗抑郁研究的行为药理学模型,如强迫游泳、悬尾、学习记忆障碍等。强迫游泳是一种经典的抗抑郁药筛选、评价模型,具有操作简单、快捷、预测性高的特点^[1]。2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷(THSG)属二苯乙烯类化合物,分子式为 C₂₀H₂₂O₆,是何首乌中的专属性药效成分^[2]。研究发现,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷具有诸多药理学作用:抗氧化、抑制肿瘤生长、同时还具有较强的抗补体活性,可能参与调节机体免疫功能;能够减少大鼠模型脑海马区 A β 的生成,降低血清胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平,改善血液流变学等^[3-5]。但至今未见关于 THSG 具有抗抑郁作用的报道。本研究采用经典的动物模型小鼠悬尾实验、小鼠强迫游泳实验、药物诱导的抑郁状态实验,观察 THSG 的抗抑郁作用及可能机制^[6-9],为研发高效、低毒的抗抑郁新药提供依据。

1 材料

1.1 动物 雄性昆明系小鼠,开始试验体重 18 ~

22 g,购于四川省医学实验动物中心,SCXK[川]2008-14,每天接受 12 h 光照/12 h 黑暗,光照周期为 8:00 ~ 20:00,实验室温度 (20 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,湿度 60%,动物可以自行摄取标准饲料和清洁用水,动物实验遵守国际实验动物伦理学要求。小鼠适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 药物与试剂 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷(自制),用 0.5% 梭甲基纤维素水溶液制成混悬,备用;利血平(广东邦明制药有限公司),盐酸氟西汀(礼来苏州制药有限公司,批号 A070884)。

1.3 仪器 多功能小鼠自主活动记录仪 YLS-1A,北京吉安得尔科技有限公司。

2 方法

2.1 何首乌 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷(THSG)的分离 取何首乌饮片 2 kg,以 50% 乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,减压抽滤,合并 2 次提取液,减压蒸馏回收乙醇得何首乌醇浸膏。取稠膏,加水,80 $^{\circ}$ C 水浴加热分散,放冷后减压抽滤,滤液用石油醚萃取 2 次,水层用乙酸乙酯萃取,减压回收乙酸乙酯,得乙酸乙酯部分。以丙酮拌样,进行硅胶干柱层析,以氯仿-甲醇-水(20:10:1)为洗脱剂进行洗脱,洗脱完成后在紫外灯(365 nm)下切下有蓝色

荧光的谱带,洗脱,合并洗脱液,将洗脱液减压浓缩至干,即得白色晶体状 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷。

2.2 强迫小鼠游泳实验 小鼠按体重随机分为 5 组,每组 20 只,即空白对照组,阳性药盐酸氟西汀组(5 mg·kg⁻¹),THSG 高、中、低剂量组 200,100,50 mg·kg⁻¹。每日 1 次,连续给药 7 d,空白对照组给予等体积的生理盐水。正式实验前 2 d 开始对小鼠进行训练,即将小鼠单独放置水箱中,强迫游泳 10 min,然后放回鼠笼中。各组小鼠末次给予相应药物或蒸馏水 30 min 后,将小鼠头部朝下放入直径 16 cm、水深 18 cm 的游泳杯中,水温(25±2)℃,随即用秒表记录小鼠 6 min 内的不动时间。

2.3 小鼠悬尾实验 给药方法同 2.2 项。给药 30 min 后,将小鼠尾部距末端约 2 cm 处用夹子固定,使小鼠倒挂在悬尾箱内,其头部离箱底约 5 cm。小鼠悬挂 2 min 后,立刻开始观察,观察持续 6 min,累计此 6 min 内小鼠的不动时间(小鼠在空中停止挣扎,或仅有细小的肢体运动)。

2.4 对利血平诱导小鼠抑郁模型的影响

2.4.1 眼睑下垂和体温下降的观测 小鼠按体重随机分为 6 组,每组 20 只,即空白对照组,模型组,阳性药盐酸氟西汀组(5 mg·kg⁻¹),THSG 高、中、低剂量组 200,100,50 mg·kg⁻¹。每日 1 次,连续给药 7 d,空白对照组给予等体积的生理盐水。末次给药或生理盐水 30 min 后,除正常组外各组 ip 利血平 1 mg·kg⁻¹,1 h 后观察小鼠眼睑下垂的情况,计算对抗百分率。3 h 后测小鼠肛温将电子体温计探头插入小鼠肛门内约 1.5 cm 处)。

$$\text{对抗率} = \left(1 - \frac{\text{睁眼不能只数}}{\text{动物总数}}\right) \times 100\%$$

2.4.2 小鼠开场实验 分组及给药方法同 2.4.1 项,末次给药或生理盐水 30 min 后,除空白对照组外各组腹腔注射利血平 1 mg·kg⁻¹,1 h 后放入小鼠开场实验箱中,适应 2 min,观察随后 4 min 内小鼠的水平、垂直活动次数,即爬行格子数和站立次数。

2.4.3 小鼠自主活动实验 给药方法同 2.4.1 项。实验时,打开电源开关,通过定时按钮设定好时间(5 min),时间一到,仪器自动停止计数。小鼠在自主活动仪中适应 1 min 后,记录 5 min 的活动数作为自主活动的指标。小鼠末次给药后 30 min 放入小鼠自主活动仪,记录 5 min 内的活动次数。

2.5 统计学方法 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行处理,用 One-Way ANOVA

进行分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 THSG 对小鼠悬尾实验中和强迫游泳实验中不动时间的影响 如表 1 所示,与空白对照组相比,连续给药 7 d 后,THSG 高、中、低剂量组明显缩短了小鼠在悬尾实验和强迫游泳实验中的不动时间,高剂量组和中剂量组有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)对行为绝望抑郁模型具有明显的抗抑郁作用。

表 1 THSG 对小鼠悬尾实验和强迫游泳实验
不动时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	悬尾不动时间	游泳不动时间
空白对照	-	141 ± 34	68 ± 28
氟西汀	0.005	80 ± 28 ²⁾	34 ± 12 ²⁾
THSG	0.2	78 ± 23 ²⁾	33 ± 13 ²⁾
	0.1	80 ± 23 ²⁾	35 ± 14 ²⁾
	0.05	93 ± 27 ¹⁾	55 ± 18

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 THSG 对利血平诱导的抑郁状态的影响

3.2.1 对利血平所致体温下降和眼睑下垂的影响

THSG 高剂量组和中剂量组均能显著对抗利血平所致小鼠体温下降和眼睑下垂,与模型组比较差异显著($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 THSG 对 ip 1 mg·kg⁻¹利血平所致体温下降
和眼睑下垂的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体温 /℃	睁眼不能 /只	对抗率 /%
空白对照	-	37.77 ± 0.02	0	100
模型	-	35.60 ± 0.61 ³⁾	20	0
氟西汀	0.005	78.11 ± 2.02 ²⁾	6	70
THSG	0.2	36.98 ± 0.72 ²⁾	8	60
	0.1	36.56 ± 1.03 ¹⁾	10	50
	0.05	36.12 ± 0.55	14	30

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与空白对照组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.2.2 THSG 对小鼠开场实验爬行格子数和站立次数的影响 如表 3 所示,利血平所致小鼠抑郁模型的爬格数和站立次数均较空白对照组显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,THSG 低、中剂量组增加抑郁小鼠的爬格数($P < 0.01$, $P < 0.05$)但无量效关系,对利血平所致小鼠抑郁模型具有明显的抗抑郁作用。

3.2.3 THSG 对小鼠自主活动的影响 如表 4 所

表3 THSG对ip 1 mg·kg⁻¹利血平小鼠开场实验爬行格子数和站立次数的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	爬行格子数/格	站立次数/次
空白对照	-	55.77 ± 13.66	18.54 ± 4.70
模型	-	13.50 ± 4.56 ³⁾	2.50 ± 0.65 ³⁾
氟西汀	0.005	29.17 ± 10.19 ¹⁾	5.42 ± 0.30 ¹⁾
THSG	0.2	14.86 ± 3.90	1.14 ± 0.04
	0.1	11.00 ± 3.82	5.33 ± 1.73 ¹⁾
	0.05	44.67 ± 13.17 ²⁾	14.56 ± 3.21 ²⁾

表4 THSG对ip 1 mg·kg⁻¹利血平小鼠自主活动次数的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	自主活动数/次
空白对照	-	92.77 ± 20.15
模型	-	59.08 ± 14.79
氟西汀	0.005	78.11 ± 24.02
THSG	0.2	83.83 ± 19.73
	0.1	61.67 ± 18.34
	0.05	103.90 ± 22.42 ¹⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

示,连续给药7 d后,THSG的低剂量组可显著提高小鼠自主活动次数。高、中剂量组对小鼠的自主活动没有显著的影响。

4 讨论

本实验采用行为绝望模型 (behavioral despair, BD) 观察 THSG 对行为绝望及应激性抑郁中的影响发现,THSG 连续给药 7 d,明显缩短了强迫游泳和悬尾实验中的不动时间,缓解了小鼠在强迫游泳实验和悬尾实验中表现的绝望状态,表现出明显的抗抑郁作用。BD 模型包括强迫游泳实验 (forced swimming test, FST) 和悬尾实验 (tail suspension test, TST),其理论基础是:在强迫游泳或悬尾的应激条件下,动物经挣扎后出现绝望表现,即不动状态,而抗抑郁剂能缩短动物的不动时间,是筛选和观察抗抑郁药物作用效果的可靠实验方法。这种行为绝望状态被认为与抑郁症患者的症状相似。研究表明,当前大多数抗抑郁药能缩短这种不动状态时间,故这种模型被有效地应用于评价抗抑郁药的抗抑郁疗效。

利血平拮抗模型是经典的药物相互作用模型之一^[10]。药理学研究显示,利血平的基本药理作用是耗竭神经末梢囊泡内的单胺递质,由此提出了抑郁症的单胺假说。认为突触间隙单胺递质减少是抑郁发生的机制,而抗抑郁药通过阻断单胺再摄取或抑

制单胺氧化酶(MAO),使递质代谢减少而发挥抗抑郁作用^[11-12]。本研究表明,THSG 可能是通过抑制单胺类递质的摄取发挥抗抑郁作用。

本研究为首次对 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对实验性行为绝望小鼠的抗抑郁作用进行探讨,对其他动物模型的抗抑郁作用及药效作用的物质基础及作用机制还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Cryan J F,Markou A,Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents;recent developments and future needs [J]. Trends Pharmacol Sci, 2002(23) :38.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2012:164

[3] Ip S P Tse, As M Poon, M T K, et al. Antioxidant activities of *Polygonum multiflorum* Thunb. , *in vivo* and *vitro*[J]. Phyto Res,1997(11) :42

[4] Regev-Shoshani G, Shoseyov O,Kerem Z. Influence of lipophilicity on the interactions of hydroxy stilbenes with cytochrome P450 3A4 [J]. Biochem Biophys Res Commun,2004,323(2) :668.

[5] Y T Leung, K S Y Lu, G. H Zhang H, et al. Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal plant *Polygonum multiglorum* Thunb. by HPLC coupled with PAD and ESI/MS[J]. Phytochem Anal, 2007(18) :181.

[6] 李志强,常红娟. 半夏泻心汤抗抑郁作用实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4) :280.

[7] 于春泉,李蓐,张敏. 柴胡-白芍药对抗抑郁作用的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (23) :286.

[8] 孙晓菲,林青,代蓉. 天麻乙酸乙酯提取物对行为绝望小鼠的抗抑郁作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(19) :205.

[9] 原红霞,韦彩柳,程遥. 小柴胡汤抗抑郁作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15) :190.

[10] 崔广智,金树梅. 芍药苷对利血平诱导抑郁模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22) :272.

[11] 毛晶晶,张彤,王冰,等. 20(S)-原人参二醇的药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (24) :274.

[12] 李蓐,高杉,于春泉. 柴胡和白芍配伍抗抑郁作用的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (14) :313.

[责任编辑 聂淑琴]