

· 药理 ·

石菖蒲水提物对获得性无助模型的抗抑郁作用

李腾飞^{1,2}, 孙秀萍^{2,3}, 高江晖², 刘新民^{2*}, 刘华钢^{1*}

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 3. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] **目的:**探讨石菖蒲水提物(WERAT)在获得性无助模型上的抗抑郁作用及其对神经系统的作用机制。**方法:**在获得性无助实验中,将大鼠随机分为空白对照组、模型组、丙咪嗪(100 mg·kg⁻¹)组、WERAT(100,200 mg·kg⁻¹)组,连续 ig 给药 5 d。利用大鼠穿梭计算机图像实时检测分析系统给予大鼠不可逃避的足底电击建立获得性无助模型,进行条件性回避反应训练,测定大鼠的逃避失败次数;在小鼠 5-羟色胺酸(5-HTP)增强实验中,小鼠随机分为空白对照组、氟西汀(30 mg·kg⁻¹)组和 WERAT(50,100,200 mg·kg⁻¹)组测定 5-HTP 诱导的小鼠甩头次数。**结果:**在获得性无助实验中,模型组动物在第 3~5 天的逃避失败次数比正常组动物显著增加(分别为 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$),WERAT 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 在第 3~5 天能够使逃避失败次数显著减少(分别为 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$),WERAT 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 在第 4 天和第 5 天更加明显的减少逃避失败次数($P<0.01$)。在小鼠 5-HTP 增强实验中,WERAT 200 mg·kg⁻¹ 显著增加 5-HTP 诱导的小鼠甩头次数($P<0.01$)。**结论:**WERAT 在大鼠获得性无助模型上具有抗抑郁作用,其抗抑郁活性可能与增强 5-羟色胺(5-HT)神经系统的功能有关。

[关键词] 石菖蒲; 获得性无助; 5-羟色胺; 甩头; 抗抑郁作用
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0132-04
[DOI] CNKI:11-3495/R. 20111116. 1423. 003 **[网络出版时间]** 2011-11-16 14:23
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111116.1423.003.html>

Antidepressant Effect of the Water Extract of
Acori Tatarinowii Rhizoma in the Learned Helplessness Rat Mode

LI Teng-fei^{1,2}, SUN Xiu-ping^{2,3}, GAO Jiang-hui², LIU Xin-min^{2*}, LIU Hua-gang^{1*}

(1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100193, China; 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antidepressant-like effect of water extract of Acori Tatarinowii Rhizoma (WERAT) and its mechanism on the nervous system. **Method:** In the learned helplessness test, rats were divided randomly into five group: control group, non helpless group, imipramine (100 mg·kg⁻¹) and WERAT (100,200 mg·kg⁻¹). The test was administered via the oral rout, and using computer-aided controlling image analysis system for shuttle box, the rats were exprosured to inescapable footshock (IS) for the learned helplessness model. Then the conditioned avoidance testing was processed and the times of escape failure (EF) were recorded. In addition, mice were divided randomly into five groups: control group, fluoxetine (30 mg·kg⁻¹) and WERAT (50,100,200 mg·kg⁻¹). 5-hydroxy-DL-tryptophan (5-HTP) induced the head-twitch number of mice were

[收稿日期] 20110904(006)
[基金项目] 国家科技重大专项(2009ZX09103-336);“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-014)。
[第一作者] 李腾飞, 硕士, 从事中药神经药理研究, E-mail: xiaolongzhanshen@163.com
[通讯作者] * 刘华钢, 博士生导师, Tel:0771-5854846, E-mail: hgliu@263.net
* 刘新民, 博士生导师, Tel:010-62812595, E-mail: liuxinmin@hotmail.com

investigated by the accentuation of 5-HTP test. **Result:** In the learned helplessness test, compared with the control group, the times of EF of IS rats were significantly increased from days 3-5 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), WERAT at dose of $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ per day significantly reversed the effect of IS on EF from days 3-5 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), and WERAT at dose of $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ per day also more significantly reversed the effect of IS on EF from days 3-4 ($P < 0.01$); WERAT could distinctly increased the frequency of head-twitch in the 5-HTP induced head-twitches test. **Conclusions:** The results of this study demonstrate that WERAT possesses significant antidepressant-like effect in the learned helplessness mode and its mechanism may be related to enhance the function of 5-hydroxytryptamine nerve systems.

[**Key words**] Acori Tatarinowii Rhizoma; learned helplessness; 5-hydroxytryptamine; head-twitch; antidepressant effect

抑郁症属于情感性精神障碍,是一种以显著而持久的心境低落为主要特征的综合征。抑郁症是危害人类精神健康的主要疾病之一,随着现代生活节奏的加快,其发病呈蔓延之势,发病年龄逐年下降,患者群逐年扩大^[1]。石菖蒲为较常用的中药,入药历史悠久,具有开窍豁痰、醒神益智、理气活血等功效,其在抗抑郁中的作用近年来倍受人们的关注^[2-3]。本实验采用大鼠获得性无助模型和小鼠 5-HTP 增强实验进行研究,从行为学的角度观察石菖蒲水提物的抗抑郁作用。

1 材料

1.1 仪器 大鼠穿梭计算机图像实时检测分析系统由中国航天员训练中心、北京协和医学院药用植物研究所和北京鑫海华仪科技有限公司联合研制开发。大鼠穿梭计算机图像实时检测分析系统采用电脑程序控制的大鼠穿梭箱测试仪,穿梭箱由 2 个体积一致的实验箱构成,每个实验箱中间用带门洞的隔板隔为 2 个相等小室,各为 $20 \text{ cm} \times 6.5 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$,中间有 1 个小门($7 \text{ cm} \times 7 \text{ cm}$)。顶部安有 1 个 8 W 钨丝灯。各箱均通过主控器与计算机相连,箱底部为不锈钢网栅,网格的之间的距离是 1 cm,与电击装置相连。

1.2 动物 ICR 小鼠($20 \sim 24 \text{ g}$)50 只和 Wistar 大鼠($180 \sim 200 \text{ g}$)50 只,SPF 级,均由军事医学科学院实验动物中心提供[SCXK(军)2007-004]。动物分笼饲养,每笼 5 只,自由饮水和摄食。动物房中照明周期 12/12 h(早上 8 点开灯),温度 $23 \sim 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度条件为 $55\% \pm 10\%$ 。动物在饲养环境适应 7 d 后开始实验。

1.3 样品 石菖蒲生药材购买于北京同仁堂大药店,经中国医学科学院药用植物研究所张本刚教授鉴定。石菖蒲生药材用盐水液提取以除去其挥发油成分,至挥发油量不变,减压抽滤,水液以大孔树脂

吸附,先以水洗去杂质,再以 95% 乙醇淋洗,洗脱液减压蒸干,最后得到干燥的红棕色粉末状石菖蒲水提物(WERAT)。石菖蒲水提物用蒸馏水溶解。

1.4 药品 盐酸氟西汀(fluoxetine hydrochloride)对照品购自中国食品药品检定研究院,50 mg,批号:100513-200401。帕吉林(pargyline),5-羟色胺酸(5-HTP, 5-hydroxy-DL-tryptophan)和盐酸丙咪嗪(imipramine hydrochloride,IMI)均购自 Sigma 公司。帕吉林和 5-HTP 用 0.9% 的生理盐水溶解,盐酸氟西汀和盐酸丙咪嗪均用蒸馏水溶解。

2 方法

2.1 大鼠获得性无助实验

2.1.1 分组及给药 用于获得性无助实验的 Wistar 大鼠 50 只随机分成 5 组,分别为空白对照组、模型组、阳性药组采用盐酸丙咪嗪($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和 WERAT($100, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),空白对照组和模型组分别给予蒸馏水。本实验采用亚慢性口服给药方式,给药体积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。第 1 天在模型诱导训练结束后 1 次给予全天剂量,第 2~5 天每天分 2 次给予全天药量。每天第 1 次在训练前 1 h 给药,第 2 次在 16:00 PM 给药,2 次给药剂量均相等。根据文献^[4-5],大鼠获得性无助实验共进行 5 d,分为 2 部分。

2.1.2 获得性无助抑郁模型诱导期 第 1 天实验时将大鼠放入电击诱导实验箱中,每箱 1 只,连续给予 60 次无信号不可逃避的双室足底电击,采用 40 V 的电压,每次电击持续 15 s,间歇期半随机化(程序控制为 45,60,75 s),每只大鼠训练 1 次。正常组(no inescapable shock NIS)动物放入实验箱内同样时间(1 h),但不给予足底电击。

2.1.3 条件性回避反应学习期 第 3 d(电击诱导 48 h 后)进行条件性回避反应训练,每天 1 次,上午进行。训练时,将大鼠放入穿梭箱中,每箱 1 只,适

应 5 min 后,连续进行 30 个运行周期。每个运行周期的时间为 30 s,依次为 3 s 条件刺激(灯光)期,3 s 条件 + 非条件刺激(电击 35 V)期和 24 s 间歇期(不给任何刺激)。当大鼠在仅有灯光的条件刺激期穿梭到箱的另一侧以免遭电击时,记为回避反应(avoid response);当大鼠在同时具有灯光和电击刺激的情况下穿梭到箱的另一侧以躲避电击时,则记为逃避反应(escape response)。实验程序由计算机控制,回避次数及逃避次数由计算机自动记录。第 4,5 天实验方法和第 3 d 一样,但是不用进行穿梭箱适应。观测指标为逃避失败(escape failure,EF)次数 = 30 - (回避次数 + 逃避次数)

2.2 小鼠 5-HTP 增强实验 用于 5-HTP 诱导的甩头实验^[6-7]的 ICR 小鼠随机分成 5 组,分别为空白对照组(蒸馏水,ig)、盐酸氟西汀(30 mg·kg⁻¹,ig)、WERAT 低、中、高 3 个剂量组(50,100,200 mg·kg⁻¹,ig)。每日上午 8 时 ig 给药,给药体积均为 20 mL·kg⁻¹,每天 1 次,连续 3 d,阳性药组前 3 d 为灌胃蒸馏水,盐酸氟西汀组为实验前 60 min 灌胃给药。第 4 天上午开始进行实验,各组小鼠均 ip 单胺氧化酶抑制剂帕吉林 100 mg·kg⁻¹;90 min 后氟西

汀组 ig 给予盐酸氟西汀 30 mg·kg⁻¹,其他各组按上述给药不变;给药 60 min 后,ip 10 mg·kg⁻¹ 5-HTP (注射容积为 10 mL·kg⁻¹),并立即放入 24 cm × 15 cm × 15 cm 的小鼠箱内,开始观察,计数 15 min 内小鼠的累积甩头次数。

2.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间数据用 *t* 检验和单因素方差分析。*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠获得性无助实验 与正常对照组比较,模型组动物在 IS 诱导后第 3 至第 5 d,逃避失败次数均明显增加(*P* < 0.01 或 *P* < 0.05)。与模型组比较,连续 ig 盐酸丙咪嗪 100 mg·kg⁻¹在第 3 ~ 5 天均可以显著逆转 IS 诱导的逃避失败次数增加,使之恢复到正常水平(分别为 *P* < 0.05, *P* < 0.01 和 *P* < 0.01);同样,连续 ig 给予 WERAT(100 mg·kg⁻¹)与模型组相比较,在第 3 ~ 5 天能够使逃避失败次数显著减少(分别为 *P* < 0.05, *P* < 0.01 和 *P* < 0.05),WERAT(200 mg·kg⁻¹·d⁻¹)在第 4 d 和第 5 d 与模型组相比较均表现出更加明显的显著性差异(为 *P* < 0.01 和 *P* < 0.01)(表 1)。

表 1 石菖蒲水提物对大鼠获得性无助失败次数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹ d ⁻¹	<i>n</i>	失败次数/次		
			第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常	0	10	10.50 ± 5.87	9.20 ± 4.54	7.60 ± 4.30
模型	0	10	21.20 ± 5.88 ³⁾	21.90 ± 7.59 ³⁾	20.20 ± 6.37 ³⁾
丙咪嗪	100	9	13.50 ± 4.37 ²⁾	6.25 ± 4.37 ²⁾	9.29 ± 7.02 ²⁾
石菖蒲水提物	100	9	15.78 ± 5.02 ¹⁾	12.67 ± 5.83 ²⁾	13.11 ± 7.61 ¹⁾
	200	9	15.63 ± 1.79 ¹⁾	8.56 ± 5.32 ²⁾	7.11 ± 5.06 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与正常组比较³⁾ *P* < 0.01。

3.2 小鼠 5-HTP 诱导的甩头行为 正常组、氟西汀组、WERAT(50,100,200 mg·kg⁻¹)组的甩头次数分别为(11.82 ± 7.22), (51.1 ± 16.69), (14.20 ± 3.94), (22.18 ± 7.15), (26.00 ± 14.58)次。该实验结果表明注射 5-HTP 的正常组仅引起少量甩头行为,然而 SSRIs 类抗抑郁剂氟西汀(30mg·kg⁻¹)可显著增加 5-HTP 诱导的甩头行为(*P* < 0.01);WERAT 高剂量(200mg·kg⁻¹)也可以明显增强这种甩头行为(*P* < 0.01)。表明 WERAT 高剂量组抗抑郁的活性可能与增强 5-HT 神经系统的功能有关。

4 讨论

当前社会经济的发展,生活节奏的加快及都市化等造成了抑郁症发病率逐年增长。此外,许多严

重疾病如心脑血管病、癌症等也常合并抑郁症,因此加强抑郁症的防治研究具有重要战略意义。由于抑郁症发病机制甚为复杂,诱发原因较多。目前,抑郁症的治疗仍以药物治疗为主,从天然植物中寻找、研制理想的抗抑郁药物,愈来愈引起国内外医药工作者的重视。

大鼠获得性无助抑郁模型是 Seligman 等在 20 世纪 70 年代建立的一种评价抗抑郁剂的动物模型^[8],它作为一种经典的抑郁症动物模型,已被广泛应用于抑郁症的研究^[9]。该模型对抗抑郁药有较高的选择性和特异性,药理作用时程与临床相吻合,动物的行为表现颇似抑郁症病人的某些特征,用于抑郁症和抗抑郁药的研究是比较理想的模型^[10]。

其原理是给予动物连续的非控制性令其厌恶的刺激(电击),经多次处理后,即便将其放入可逃避性的环境中,也可呈现逃避(或操作)行为缺失,而抗抑郁剂能够翻转或减少这种行为缺失。本研究显示,丙咪嗪和 WERAT 均能明显减少大鼠在获得性无助后的逃避失败次数,但是 WERAT 的作用效果仍低于阳性药丙咪嗪。

5-HTP 诱导的小鼠甩头实验是通过腹腔注射给予 5-HT 的前体 5-HTP 后,经转运透过血脑屏障进入中枢,增加外源性 5-HT 水平,通过激动脑内 5-HT₂受体,可以引起小鼠甩头行为,三环类抗抑郁药和选择性 5-HT 重吸收抑制剂均可通过增强脑内 5-HT 神经系统功能加强这种甩头行为^[7,11]。本实验中 WERAT 中、高剂量组可与 5-HTP 产生协同作用,使小鼠甩头次数明显增加,反映该药物能促进中枢神经细胞突触间隙 5-HT 浓度提高,表明其抗抑郁活性可能与其抑制中枢 5-HT 重摄取或增强脑内 5-HT 神经功能有关,但其详细作用机制仍有待进一步的研究探讨。

综上所述,WERAT 对大鼠获得性无助抑郁模型具有确切的治疗作用,而且对 5-HT 这种神经递质的传导途径也存在一定的影响,但是否能作为一种新型的 SSRI 类抗抑郁药物进行开发,还有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Murray C J, Lopez A D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global burden of disease study [J]. *Lancet*, 1997, 349 (9063): 1436.
- [2] 康健,李作平.抗抑郁天然药物的研究概况[J].*中成药*, 2006, 28(5): 713.

- [3] 郑虎占. 中药现代研究与应用:第二卷[M]. 北京:学苑出版社, 1997:1356.
- [4] Martin P, Soubrie P, Simon P. The effect of monoamine oxydase inhibitors compared with classical tricyclic antidepressants on the learned helplessness paradigm [J]. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 1987, 11, 1.
- [5] Ferguson S M, Brodtkin J D, Lloyd G K, et al. Antidepressant-like effects of the subtype-selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, SIB-1508Y, in the learned helplessness rat model of depression [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2000, 152(3): 295.
- [6] Goodwin G M, Green A R, Johnson P. 5-HT₂ receptor characteristics in frontal cortex and 5-HT₂ receptor-mediated head-twitch behavior following antidepressant treatment to mice [J]. *Br J Pharmacol*, 1984, 83 (1): 235.
- [7] Corne S J, Pickering R W, Warne B T. A method for assessing the effect of drugs on the central action of 5-hydroxytryptamine [J]. *Br J Pharmacol*, 1983, 20: 106.
- [8] Seligman M E, Beagly G. Learned helplessness in the rat [J]. *Comp Physiol Psychol*, 1975, 88 (2): 534.
- [9] Willner P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1986, 10: 677.
- [10] Porsolt R D. Animal model of depression: utility for transgenic research [J]. *Rev Neurosci*, 2000, 11 (1): 53.
- [11] 刘效巍. 5-羟色胺受体与抑郁症 [J]. *临床精神医学杂志*, 2002, 12(6): 375.

[责任编辑 聂淑琴]