

逍遥散抗抑郁作用最佳剂量筛选

崔杰^{1,2}, 郑兴宇^{1,2}, 高晓霞², 秦雪梅^{2*}

(1. 山西大学化学化工学院, 太原 030006; 2. 山西大学中医药现代研究中心, 太原 030006)

[摘要] 目的: 筛选逍遥散抗抑郁作用的最佳剂量, 为提高临床疗效奠定基础。方法: 采用慢性轻度不可预知应激模型 (CUMS), 通过 2 次实验, 造模的同时给予不同剂量的逍遥散加以治疗, 实验 使用阿米替林作为阳性对照, 实验 使用文拉法辛和百忧解作为阳性对照。观察大鼠行为学变化, 测定大鼠体重、旷场和糖水消耗实验等行为学指标; 并收集尿液生物样本, 采用 GC-MS 分析, 数据用 SPSS 和 SIMCA-P 软件进行分析。结果: 通过 2 次实验的行为学, 显示对照组和模型组具有显著性差异, 同时 GC-MS 数据分析, 2 组几乎没有交叉, 能够很好的分开, 均表明造模成功; 各给药组与阳性药组和空白组相比, 发现给药剂量为 $46.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生药量时与对照组和文拉法辛阳性药组更加接近, 比阿米替林和百忧解阳性药组抗抑郁效果好。结论: 逍遥散具有明显的抗抑郁作用, 且经过 2 次实验均证明 $46.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为大鼠最佳剂量, 提示临床上人的日用剂量 (原处方生药材比例) 约为 370 g。

[关键词] 尿液; 最佳剂量; CUMS; 逍遥散; 抗抑郁; 代谢组学

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0194-05

Optimal Dose for Anti-depression Effect of Xiaoyaosan

CUI Jie^{1,2}, ZHENG Xing-yu^{1,2}, GAO Xiao-xia², QIN Xue-mei^{2*}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;
2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

[Abstract] Objective: To screen the optimal dose of Xiaoyaosan in rats and to improve the anti-depression clinical effect. **Method:** In this research, two experiments were processed using the model of chronic unpredictable mild stress (CUMS). Amitriptyline and fluoxetine hydrochloride, venlafaxine hydrochloride were used as positive control, respectively. Behavioral changes, such as the weight, open-field, and sugar consumption, were measured. The urine was collected and analyzed by GC-MS, and the result was analyzed with SPSS and SIMCA-P. **Result:** The results of behavior changes and GC-MS suggested that the control group and model group were significantly different, which indicated that the model was successful. Comparing the treated group with the positive control group and the control group, the dose of $46.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ was closest to the control group, there was no significant difference. **Conclusion:** Xiaoyaosan has the obvious anti-depression effect, and $46.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ was proved the optimal dose.

[Key words] urine; optimal dose; CUMS; Xiaoyaosan; anti-depression; metabolomics

[收稿日期] 20100612(001)
[基金项目] 科技部国际合作项目(2008DFA30430); 国家自然科学基金项目(30772759); 山西省科技厅/国际科技合作项目(2008081043); 山西省人事厅/人才引进与开发专项资金
[第一作者] 崔杰, 硕士研究生, Tel: 15135118320, E-mail: cuijiejinan@126.com
[通讯作者] * 秦雪梅, 博士, 教授, 主要研究方向: 中药质量控制与活性成分研究、中医药代谢组学研究, Tel: 0351-7011202, E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

抑郁症是一种常见的精神疾病, 近年来其发病率不断上升, 已经成为世界性的主要精神疾病之一, 严重时会出现自杀倾向, 但临床却没有很理想的抗抑郁药物, 从传统的药物中研发理想的抗抑郁药成为热点。逍遥散方出自《太平惠民和剂局方》, 由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、生姜、薄荷和甘草共 8 味药组成, 是疏肝解郁、调和肝脾的代表方剂, 是治疗抑郁症最常用的经典名方之一, 临床及实验研究均

显示该方有确切的抗抑郁作用^[1-5]。但是用药剂量却存在差异,给临床用药带来诸多不便。《太平惠民和剂局方》^[6]中的传统用量为柴胡、当归、白芍、白术、茯苓各 50 g,炙甘草 25 g,生姜 1 块,薄荷少许。现代研究中熊静悦等^[7]采用剂量为柴胡、当归、白芍、白术、茯苓各 9 g,薄荷、生姜、甘草各 4.5 g;陈家旭^[8]课题组则采用的剂量是北柴胡、当归、白芍、白术、茯苓各 30 g,炙甘草 15 g,生姜、薄荷各 10 g;宋雨婷等^[9]采用柴胡、当归、芍药、白术、茯苓各 30 g,炙甘草 15 g,煨姜、薄荷各 1 g。本研究通过 2 次实验采用慢性轻度不可预知应激模型(CUMS),分别使用 3 种阳性对照药,进行行为学和 GC/MS 分析,研究了 SD 大鼠逍遥散的用药剂量,为临床合理用药提供实验依据。

1 材料

代谢笼(苏州实验动物笼具厂);LD500-1 电子天平(沈阳龙腾电子有限公司);YSD-4 药理生理实验多用仪(蚌埠医学院无线电二厂);101 系列恒温干燥箱(北京和同创业科技有限责任公司);气相色谱质谱联用仪(Trace PolarisQ Thermo Finnigan);SPSS 11.5 统计分析软件(Chicago, USA)。

N-甲基-*N*-(三甲基甲硅烷基)-2,2,2-三氟代乙酰胺(MSTFA, Thermo scientific);逍遥散药材柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、生姜、薄荷、炙甘草(均购自山西省华阳药业),均由山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定;阿米替林(湖南洞庭药业股份有限公司,批号 H43020561,规格 25 mg/粒);百忧解(盐酸氟西汀胶囊)(Eli Lilly and Company Limited,批号 A338350,规格 20 mg/粒);博乐欣(盐酸文拉法辛胶囊,批号 071104,规格 25 mg/粒,成都大西南制药股份有限公司);水提物:水煎提取,浸膏干燥制粉;蔗糖(北京美味先食品有限公司)。

2 方法

2.1 药物的制备

分别取适量药材按逍遥散处方比例混合,用水煎煮,过滤后浓缩,制成按生药量计为 4.63 (HX), 2.31 (MX), 1.16 (LX) g·mL⁻¹ 的逍遥散水提物;阿米替林阳性药以水作为溶剂,制成 1.35 g·L⁻¹ 的药液,备用。以同样的制备方法,制成按生药量计为 9.25 (VHX), 4.63 (HX), 2.31 g·mL⁻¹ (MX) 的逍遥散水提物;文拉法辛、百忧解同样以水作为溶剂,制成药液分别为 2.5, 0.6 g·L⁻¹, 备用。

2.2 分组

SD 成年雄性健康 SPF 级大鼠,体重 180 ~ 200 g 中国药品生物制品检定所动物实验中心提供[合格证号 SCXK(京)2005-0004]。将大鼠置于昼夜节律光照条件下,自由进食进水饲养 3 d 适应环境,每日触摸动物以适应实验人员的操作。3 d 后采用 open-field 法进行行为学评分,根据行为学评分和体重将大鼠随机分组。

本实验共进行 2 次,实验根据行为学评分和体重,随机分为 6 组,每组 10 只,包括逍遥散高(HX)、中(MX)、低(LX) 3 个剂量组,阿米替林(YX)阳性药组,空白组(NS),模型组(MS)。实验同样根据行为学评分和体重,随机分为 7 组,每组 10 只,包括逍遥散高(VHX)、中(HX)、低(MX) 3 个剂量组,文拉法辛(YW)、百忧解(YB)阳性药组,空白组(NS)及模型组(MS)。

2.3 CUMS 模型的建立与给药

除空白组外,其他各组均在灌胃 30 min 后按程序给予应激刺激。参照文献[10-11]方法并结合实际加以改进,刺激方法包括:夹尾 1 min;禁水(24 h);电击足底(电压为 50 mV,每隔 30 s 刺激 1 次,持续 10 s,共 15 次);陌生物品(如塑料杯、木勺、碎布片等);禁食(24 h);4 冰水游泳 5 min;潮湿垫料和倾斜 45°;束缚应激 4 h;45 热应激 5 min;噪音刺激(60 Hz, 1 h)。每种刺激累计使用 2 ~ 3 次,每日 1 次,顺序随机,同种刺激不能连续出现,使动物不能预料刺激的发生,刺激实验周期为 21 d。给药组及模型组予同时以孤养。空白组群养不予任何刺激。

在造模的同时,每周称量 1 次大鼠体重并根据体重计算给药量,给药组分别以 10 mL·kg⁻¹ 剂量灌胃给予不同剂量的逍遥散水提物和 3 种阳性药液;空白组(NS)和模型组(MS)灌胃给予等体积的生理盐水。

2.4 行为学方法

2.4.1 旷场实验(open-field)^[12]

将单只大鼠置于长宽各 80 cm、高 40 cm 光洁敞箱中央,敞箱底面划分为 16 个等边方格,内面用黑漆涂满,观测动物 5 min 内的活动情况:观察指标包括中央格停留时间(自大鼠被放入中央格至其三爪跨离该格的时间,以 s 计)、水平穿越格数(以穿越底面方格数为其水平得分,穿越 1 格为 1 分)、垂直运动(两前腿离地或爬墙壁)、理毛时间及粪便粒数。并在彻底清洁敞箱后

再进行下只动物的得分测定。每 7 d 进行 1 次行为学实验。在旷场实验中,水平穿越格数、中央格停留时间、垂直运动、理毛时间等行为体现了动物运动能力、社交能力和动物对周围环境的要求及对自身的关注度。当这些行为学指标下降,表明其运动能力和社会交往能力下降、探索行为能力降低,动物对周围环境的要求及对自身的关注下降,以上均反应模型动物的精神状态^[12]。

2.4.2 糖水消耗实验 在造模前 1 d 及造模第 21 天进行糖水消耗实验,在进行糖水消耗实验时所有大鼠均单笼饲养,每只大鼠加 1% 蔗糖溶液 100 mL,同时所有大鼠进行禁食,计算大鼠 4 h 饮用 1% 蔗糖溶液的量。糖水消耗实验模拟了抑郁症的核心症状——快感丧失。糖水摄入比例下降,显示其处于抑郁状态^[13]。

2.4.3 大鼠体重改变 实验开始前 1 d 及实验第 21 d 时,分别称取各组大鼠体重,并观测大鼠体重变化情况。动物体重变化可反应动物饮食量变化,实际生活中抑郁症患者食欲降低、体重明显减轻、性欲减退等^[14]。

2.4.4 行为学数据分析 行为学数据运用 SPSS 11.5 软件,采用方差分析进行统计处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 作为差异判断是否有显著性。

2.5 尿样的采集与 GC/MS 代谢组学分析

2.5.1 尿样采集 大鼠饲养至第 21 天进行处理。采用大鼠代谢笼在 21 d 冰上采集尿液,采集时间为 20:00—次日 08:00,尿液生物样本采集后保存于 -80 °C 冰箱中,留待分析。

2.5.2 尿样的衍生化 参照文献[15]方法,同时结合本实验室具体情况。取尿液 200 μL 加入 30 U 尿素酶,37 °C 孵育 15 min,600 μL 甲醇;在 4 °C,13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下,离心 10 min;取上清液 300 μL ,30 °C 真空干燥 12 h;加入 30 μL 甲酰胺,70 °C 反应 1 h,加入 50 μL MSTFA,40 °C 反应 90 min,加入 1 200 μL 正庚烷(0.1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 二十四烷),涡旋。

2.5.3 色谱和质谱条件 色谱柱:DB-5MS 毛细管柱 (crossbond 5% diphenyl cross-95% dimethylpolysiloxane, 0.25 $\mu\text{m} \times 250 \mu\text{m} \times 30 \text{m}$; Agilent J&W Scientific, Folsom, USA);分流比 10:1,进样量 1 μL ;进样口温度 260 °C,离子源温度 200 °C;程序升温起始温度 60 °C,保持 2 min,以 7 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 140 °C,以 5 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 180 °C,保持 6

min,再以 5 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 280 °C,保持 2 min;载气氦气,载气流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。质谱检测条件为电离方式 EI,电子能量 70 eV,质谱扫描范围 m/z 50 ~ 550。

2.5.4 GC/MS 数据分析 GC-MS 图谱经 XCMS (<http://met.in.scripps.edu/download/>) 预处理后,采用 Excel 软件对数据进行归一化,采用 SIMCA P11.0 软件包(瑞典,Umetrics AB,Umea)进行最小二乘法判别分析(partial least squares discriminate analysis,PLS-DA),得到散点图。图中每组之间距离的远近表示组别之间的差异性,距离越远表明差异性越大。

3 结果

3.1 行为学统计分析结果 模型组 MS 与空白组 NS 除个别次要指标如粪便粒数、理毛时间,其他重要指标如水平运动、糖水偏爱、中央格停留时间等均具有显著性差异,行为学指标考察显示 2 次造模均成功。同时 2 次实验均显示逍遥散 HX 组即 46.3 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 与空白组各行为学重要指标均很相近,与模型组差别较大。实验 1 中阳性药阿米替林行为学重要指标与模型组相比具有显著性差异,但是抗抑郁作用不如 HX 组;实验 2 中文拉法辛和百忧解 2 种阳性药行为学重要指标与模型组比较同样显示有显著性差异,两者相比文拉法抗抑郁效果好于百忧解,HX 组与文拉法辛组作用效果较为接近。综上所述逍遥散 HX 组相比其他剂量组具有更好的抗抑郁作用。

3.2 尿液的 GC-MS 分析 尿液衍生化产物 GC-MS 分析的总离子流色谱图见图 1~2,由两图可以直观看出 NS 组和 MS 组尿液中峰相比较,空白组峰的数量较多,峰高较高,2 组差距较大。

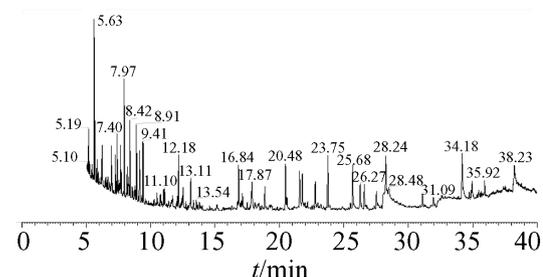


图 1 空白组(NS)大鼠 21 d 尿液 GC-MS 总离子流色谱

大鼠 21 d 尿液 GC-MS 分析得 PLS-DA 散点图见图 3~4,由图可知从主成分 t^2 可以看出模型组 (MS) 和空白组 (NS) 之间没有交叉,能够很好的分开,说明两者的代谢产物有很大的不同,造模成功。

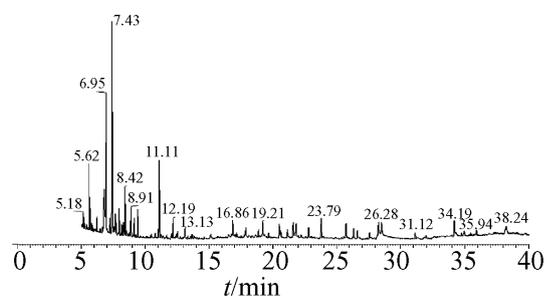


图 2 模型组(MS)大鼠 21 d 尿液 GC-MS 总离子流色谱

另外,从图中可以看出不同剂量的逍遥散给药组、阳性药组和空白组相比: 实验 逍遥散 HX 组更接近于空白组, MX 组离阿米替林阳性药组较近但离空白组较远,说明 HX 组抗抑郁效果高于 MX 组,且比阿米替林阳性药组效果好, LX 组较分散,效果最差,即 HX 组逍遥散的抗抑郁效果最好。 实验 逍遥散 HX 组分布更接近于空白组和文拉法辛阳性药组, MX 组离百忧解阳性药组较近但离空白组距离较远, VHX 组介于 HX 组和 MX 组之间,说明 HX 组逍遥散的抗抑郁效果与文拉法辛阳性药组差距不大, MX 组与百忧解阳性药组作用效果接近, VHX 组作用效果低于 HX 组,但是高于 MX 组,再一次证明 HX 组逍遥散的抗抑郁效果最佳。

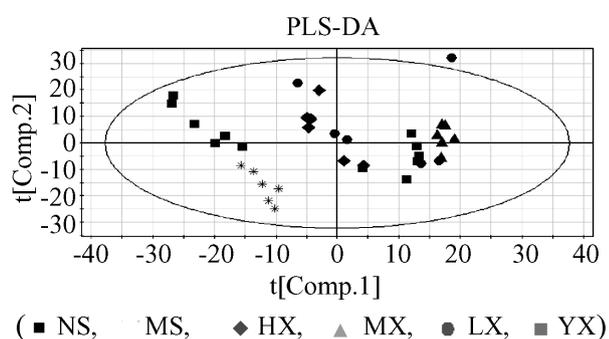


图 3 实验 大鼠 21 d 尿液 GC-MS 分析得 PLS-DA 散点

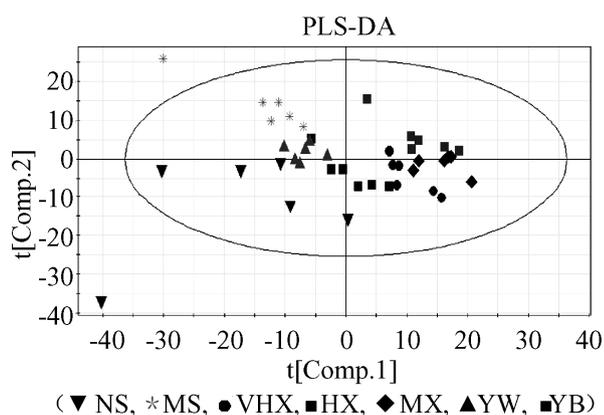


图 4 实验 大鼠 21 d 尿液 GC-MS 分析得 PLS-DA 散点

4 讨论与结论

通过查阅文献可知,逍遥散临床人用剂量范围是 167 ~300 g, 又根据人与大鼠间药物剂量的换算公式计算得出大鼠剂量为 27.8 ~50.0 g, 据此设计了实验 。

通过实验 可知 HX 给药组抗抑郁作用效果最

明显,但是该给药组在实验 中为最高剂量组,为了选出更合理的最佳有效剂量组,在实验 的基础上,将 HX 组设计为中剂量组,加设一组高剂量组 (VHX),设计了实验 ,实验结果表明 HX 组抗抑郁作用效果仍然最明显,使结果更可靠。经过两次实验得出 $46.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以生药量计算) 为逍遥散抗抑郁作用最佳有效剂量。即推荐逍遥散临床用药剂量约为 370 g。

实验 中增大剂量 VHX 组 ($92.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 效果没有 HX 组 ($46.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 好,可能存在以下原因: 大鼠胃肠道的吸收存在饱和现象,提示它在机体内的转运机制类似于主动转运或促进扩散,这说明并不是所有中药加大剂量都能增强药理效应^[16]。中药的某种化学成分具有肝药酶诱导剂的作用,使药酶活性增强,加快自身或其他化学成分的代谢,失去药理活性^[17]。

本研究中 2 次实验使用了不同的阳性药,阿米替林为三环类,百忧解为选择性 5-羟色胺再摄取阻滞剂,文拉法辛为选择性 5-羟色胺及去甲肾上腺素再摄取抑制剂。通过本实验可知在 3 种阳性药中,行为学数据和大鼠 21 d 尿液 GC-MS 数据分析结果均显示文拉法辛阳性药组与空白组最为接近,表明文拉法辛在抗抑郁作用中效果最明显。

通过 GC-MS 方法分析,PLS-DA 散点图中空白组与模型组几乎无交叉,能够完全分离,说明模型复制成功,其余各组的分析结果也与行为学等常规分析结论一致。由于代谢组学方法与常规方法相比具有以下优点: 反应内源产物多,具有整体性。可以对机体进行动态观察。可以寻找到传统方法所提取不到的生物标志物,因此代谢组学方法可用于逍遥散抗抑郁作用的最佳用药剂量的筛选研究。

本文采用 CUMS 模型,通过 2 次实验,造模的同时给予不同剂量的逍遥散加以治疗,与 3 种不同作用机制的阳性药对照,观察大鼠行为学变化,同时收集尿液生物样本,进行代谢组学分析。结果显示,空白组和模型组具有显著性差异,造模成功;且给药剂量为 $46.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生药量时与空白组和文拉法辛阳性药组更加接近,比阿米替林和百忧解阳性药组抗抑郁效果好,提示临床上人的日用剂量(原处方生药材比例)约为 370 g。

[参考文献]

[1] 卫生部疾病控制司. 中国抑郁障碍防治指南(试行)

- [S] . 2003.
- [2] 裘影萍. 发展中药抗抑郁药 [N] . 中国中医药报, 2004-11-03.
- [3] 张美增, 张秋英, 崔广宝. 逍遥散治疗抑郁性神经症临床研究 [J] . 山东中医药大学学报, 1998, 22(1) : 34.
- [4] 高萧枫, 秦雪梅, 王明军. 逍遥散和柴胡对慢性束缚应激肝郁模型大鼠脑内单胺类神经递质的影响 [J] . 中药药理与临床, 2005, 21(2) : 6.
- [5] 吴红彦, 王虎. 逍遥散及其拆方对老年性痴呆模型小鼠学习记忆能力及抗氧化能力的影响 [J] . 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(10) : 102.
- [6] 张文阁. 逍遥散源流 [J] . 陕西中医学院学报, 1981(3) : 23.
- [7] 熊静悦, 曾南, 张崇燕, 等. 逍遥散对 CUMS 模型大鼠行为学及脑内单胺类神经递质的影响 [J] . 现代医学生物进展, 2007, 7(11) : 1635.
- [8] 陈家旭, 唐已婷. 慢性束缚应激模型大鼠相关脑区前阿黑皮素基因表达的变化及中药复方的影响 [J] . 中国药物与临床, 2003, 3(3) : 223.
- [9] 宋雨婷, 王玉江, 周正顺, 等. 逍遥散的抑瘤作用研究 [J] . 长春中医药大学学报, 2006, 22(2) : 62.
- [10] Willner P, Benton D, Brown E, et al. Depression increases craving for sweet rewards in animal and human models of depression and craving [J] . Psychopharmacology Berl, 1998, 136(3) : 272.
- [11] Wu L M, Han H, Wang Q N, et al. Mifepristone repairs region-dependent alteration of synapsin I in hippocampus in rat model of depression [J] . Neuropsychopharmacology, 2007, 32(12) : 2500.
- [12] Dai Y T, Li Z Y, Xue L M, et al. Metabolomics study on the antidepressant effect of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress [J] . J Ethnopharmacology, 2010, 128: 482.
- [13] Wang X, Zhao T, Qiu Y, et al. Metabonomics approach to understanding acute and chronic stress in rat models [J] . J Proteome Res, 2009, 8: 2511.
- [14] 谭庆荣, 王家华. 精神病学 [M] . 西安: 第四军医大学出版社, 2006: 127.
- [15] 谢国祥, 贾伟. 基于几种色谱分析方法的生物样本的代谢组学研究 [D] . 上海: 上海交通大学, 2006: 102.
- [16] 王红丽. 关于中药饮片处方药味、剂量的调查分析 [J] . 中国医院用药评价与分析, 2009, 9(5) : 257.
- [17] 佟海岩. 浅议中药的量效关系 [J] . 贵阳中医学院学报, 2005, 27(3) : 48.

[责任编辑 邹晓翠]