

## · 论著 ·

## 绿萼梅总黄酮对慢性温和刺激所致抑郁大鼠神经内分泌和氧化应激的影响

陈 静, 陈明珠, 黄玉香, 程 晶, 黄雅平 (泉州医学高等专科学校药理学教研室, 福建 泉州 362000)

**[摘要]** 目的 通过观察绿萼梅总黄酮(TFAM)对慢性温和刺激抑郁大鼠神经内分泌及氧化应激的影响,探讨其可能的抗抑郁机制。方法 将SD大鼠随机分为6组:生理盐水组、模型组、阳性对照组(氟西汀,20 mg/kg)、低剂量治疗组(TD-TFAM,80 mg/kg)、中剂量治疗组(TZ-TFAM,160 mg/kg)和高剂量治疗组(TG-TFAM,240 mg/kg);除生理盐水组外,其余各组大鼠经历28 d慢性不可预见性温和应激(CUMS)造模成功后随机分组。通过大鼠体重增量变化、糖水偏好实验、旷场实验评估TFAM的抗抑郁作用;采用酶联免疫吸附法(Elisa)测定大鼠海马和前额叶皮层去甲肾上腺素(NA)、5-羟色胺(5-HT)、促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质酮(CORT)含量,评估TFAM对神经递质表达量的影响;通过检测大鼠血清和纹状体中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性评估TFAM对氧化应激的影响。结果 TFAM能显著增加CUMS大鼠体重增值变量,提高糖水偏爱百分比,逆转旷场实验评分,提高大鼠海马和前额叶皮层NA、5-HT的含量,降低ACTH、CORT的含量,增强大鼠血清和纹状体中GSH-Px和SOD的活性。结论 TFAM抗抑郁作用可能与促进单胺递质分泌、调节下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能和清除体内自由基有关。

**[关键词]** 绿萼梅总黄酮;抗抑郁;单胺神经递质;下丘脑-垂体-肾上腺轴;抗氧化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)03-0226-06

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.03.007

## Effects of total flavonoids from *Armeniaca mume* on neuroendocrine and oxidative stress of rats with depression induced by chronic mild stress

CHEN Jing, CHEN Mingzhu, HUANG Yuxiang, CHENG Jing, HUANG Yaping (Department of Pharmacology, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the possible mechanism of total flavonoids from *Armeniaca mume* (TFAM) through observing its effects on neuroendocrine and oxidative stress of rats with depression induced by chronic mild stress. **Methods** The SD rats were randomly divided into normal saline group, model group, positive control group (fluoxetine, 20 mg/kg), low-dose treatment group (TD-TFAM, 80 mg/kg), middle-dose treatment group (TZ-TFAM, 160 mg/kg) and high-dose treatment group (TG-TFAM, 240 mg/kg), total 6 groups. Except the normal saline group, the rats in all other groups were given chronic unpredictable mild stress (CUMS) for 28 d to build the depression models, and then were randomly assigned. The antidepressant effects were evaluated by index such as growth in weight, sucrose preference and open-field test. Its effects on neuroendocrine were evaluated by contents of noradrenaline (NA), 5-hydroxytryptamine (5-HT), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT) in the hippocampus and prefrontal cortex through enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Also, the enzymes activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) in the serum and striatum were measured to estimate its influences on oxidative stress. **Results** TFAM significantly increased the weight growth of CUMS rats, promoted the percentage of sugar water preference, reversed open-field test score, increased the contents of 5-HT and NA but reduced the contents of ACTH and CORT in the hippocampus and prefrontal cortex of rats, while the activities of SOD and GSH-Px in serum and striatum were up-regulated. **Conclusion** The anti-depressant mechanism of TFAM might be related to promoting the secretion of monoamines, regulating the function of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and removing free radicals in rats.

**[Key words]** total flavonoids from *Armeniaca mume*; depression; monoamine neurotransmitter; hypothalamic-pituitary-adrenal; HPA; antioxidant

**[基金项目]** 福建省中青年教育科研项目(JAT160848)

**[作者简介]** 陈 静, 硕士, 副教授, 研究方向: 药理学, Email: 825649654@qq.com

**[通讯作者]** 黄玉香, 博士, 讲师, 研究方向: 中药药理学, Email: 63885519@qq.com

抑郁症是一种情感精神障碍性疾病,以情感低落、思维及语言动作迟缓为主要表现,严重者可出现自杀行为。目前世界上约有3.5亿人患有抑郁症<sup>[1]</sup>,且患病率呈逐年上升趋势。因此,抑郁症治疗也越来越受到重视,已上市抗抑郁药主要针对单一

靶点治疗,效果并不理想,不良反应较多<sup>[2]</sup>。抗抑郁天然药物具有不良反应小的优点<sup>[3]</sup>,从天然植物中寻找安全高效的抗抑郁药物,是开发抗抑郁药物的重要途径之一。

绿萼梅(*Armeniaca mume* Sieb)又称白梅花,为蔷薇科植物梅的干燥花蕾,具有疏肝和中、化痰散结的功效,用于治疗肝胃气痛、郁闷心烦、梅核气、瘰疬疮毒<sup>[4]</sup>,其主要成分是黄酮类化合物<sup>[5]</sup>。课题组前期研究发现绿萼梅总黄酮(TFAM)能明显改善抑郁动物模型的抑郁行为<sup>[2-3]</sup>,为了更深入地了解TFAM的抗抑郁机制,本研究在成功建立慢性不可预见性温和应激(CUMS)大鼠抑郁模型<sup>[6]</sup>的基础上,观察TFAM对CUMS大鼠神经内分泌和氧化应激的影响,探索TFAM的可能抗抑郁作用机制,为其治疗抑郁症提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

清洁级SD雄性大鼠(100~120 g),合格证号:SCXK(沪)2012-0002,购自上海斯莱克实验动物有限公司。实验前动物房适应性饲养5 d,环境温度25℃,相对湿度70%,自由饮食和饮水。

### 1.2 药物与试剂

绿萼梅(浙江鑫森中药材,批号:150102),经泉州医学高等专科学校黄秀珍教授鉴定为绿萼梅(*Armeniaca mume* Sieb)的花。药材用70%乙醇提取后经AB-8大孔吸附树脂分离获得TFAM<sup>[7]</sup>,以芦丁为标准品,用紫外分光光度法测定TFAM含量为88.3%;盐酸氟西汀胶囊(批号:5S41A,礼来苏州制药有限公司);5-羟色胺、去甲肾上腺素、促肾上腺皮质激素、皮质酮、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶Elisa试剂盒(批号均为201801,上海酶联生物科技有限公司)。

### 1.3 仪器与设备

UV-1800PC-DS2紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);Rayto-RT-6100酶标仪(上海众生命科学发展有限公司);FA2004电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);H2050R冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 CUMS大鼠模型的建立<sup>[6,8-9]</sup>

除生理盐水组外,各组大鼠每天随机接受2种不同刺激,每种刺激至少出现2次,同种刺激不能连续出现,持续28 d,刺激种类包括:禁食(24 h)、禁水(24 h)、震荡(1 h)、冰水游泳(4℃)、彻夜照明、鼠

笼倾斜(45°)、夹鼠尾巴(1 min)、潮湿垫料(24 h)、昼夜颠倒。

### 2.2 动物分组与给药

将SD大鼠随机分为6组:生理盐水组(NS)、模型组、阳性对照组(氟西汀,20 mg/kg)、低剂量治疗组(TD-TFAM,80 mg/kg)、中剂量治疗组(TZ-TFAM,160 mg/kg)和高剂量治疗组(TG-TFAM,240 mg/kg)<sup>[6,8]</sup>,除生理盐水组外,其余5组大鼠经历28 d CUMS造模成功后随机分组。每天灌胃1次,连续4周。生理盐水组合笼饲养,其余各组大鼠单只单笼饲养。

### 2.3 体重记录

实验第7、15、28天各组大鼠禁食12 h,测定每只大鼠体重。

### 2.4 糖水偏爱实验<sup>[8]</sup>

各组大鼠在造模前禁食、禁水24 h后,每只大鼠给予1瓶蔗糖水(1%)和1瓶饮用水,于造模后第1、7、15、28天进行糖水偏爱实验,记录每只大鼠在1 h内蔗糖水和饮用水的消耗量,根据公式:糖水偏爱(%)=糖水消耗体积/(糖水消耗体积+饮用水消耗体积)×100%,计算糖水偏爱百分比。

### 2.5 旷场实验<sup>[8]</sup>

使用自制实验箱(100 cm×100 cm×40 cm),地面用白线分成25个方格,每格20 cm×20 cm,四周涂黑。安静条件下将大鼠放于实验箱中央格内,观察5 min内大鼠在中央格停留时间、站立次数、水平穿越格数、修饰次数。

### 2.6 大鼠组织标本的收集及相关指标的测定

#### 2.6.1 大鼠组织标本的收集<sup>[8]</sup>

末次给药24 h后,将大鼠断头处死,取全血,同时取大鼠脑前额叶皮层、海马、纹状体组织,全血于4℃、3 000 r/min离心10 min获得血清,各组织标本分装后存放于-80℃冰箱备用。

#### 2.6.2 5-HT、NA、ACTH、CORT的测定

取大鼠海马和前额叶皮层组织标本,经组织匀浆后离心,取上清液,分别按照5-HT、NA、ACTH、CORT的Elisa试剂盒说明书进行检测。

#### 2.6.3 SOD和GSH-Px酶活性的测定

取大鼠血清,纹状体标本匀浆后离心,取上清液,按照SOD和GSH-Px的Elisa试剂盒说明书进行检测。

### 2.7 统计学分析

数据采用SPSS 19.0软件进行统计分析,结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,两两比较采用 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析及LSD(L)检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 行为学测评

图 1A 显示,模型组的体重增加值显著低于 NS 组( $P < 0.01$ ),提示抑郁刺激对大鼠增重有影响;阳性对照组(氟西汀)和 TG-TFAM 组给药后第 15 天相对于模型组大鼠体重有所增加( $P < 0.05$ ),各给药组体重于第 28 天显著增加( $P < 0.01$ ),TFAM 对

大鼠体重的影响存在剂量依赖性。图 1B 显示,模型组大鼠糖水偏爱百分比持续走低,与模型组比较,阳性对照组和各治疗组在第 28 天时糖水消耗量升高( $P < 0.05$ )。图 1C 显示,造模后,大鼠在中央格停留时间、水平穿越格数、站立次数、修饰次数明显减少,而阳性对照组和各给药组相对于模型组上述指标均显著增加,说明 TFAM 能够逆转 CUMS 大鼠的抑郁行为。

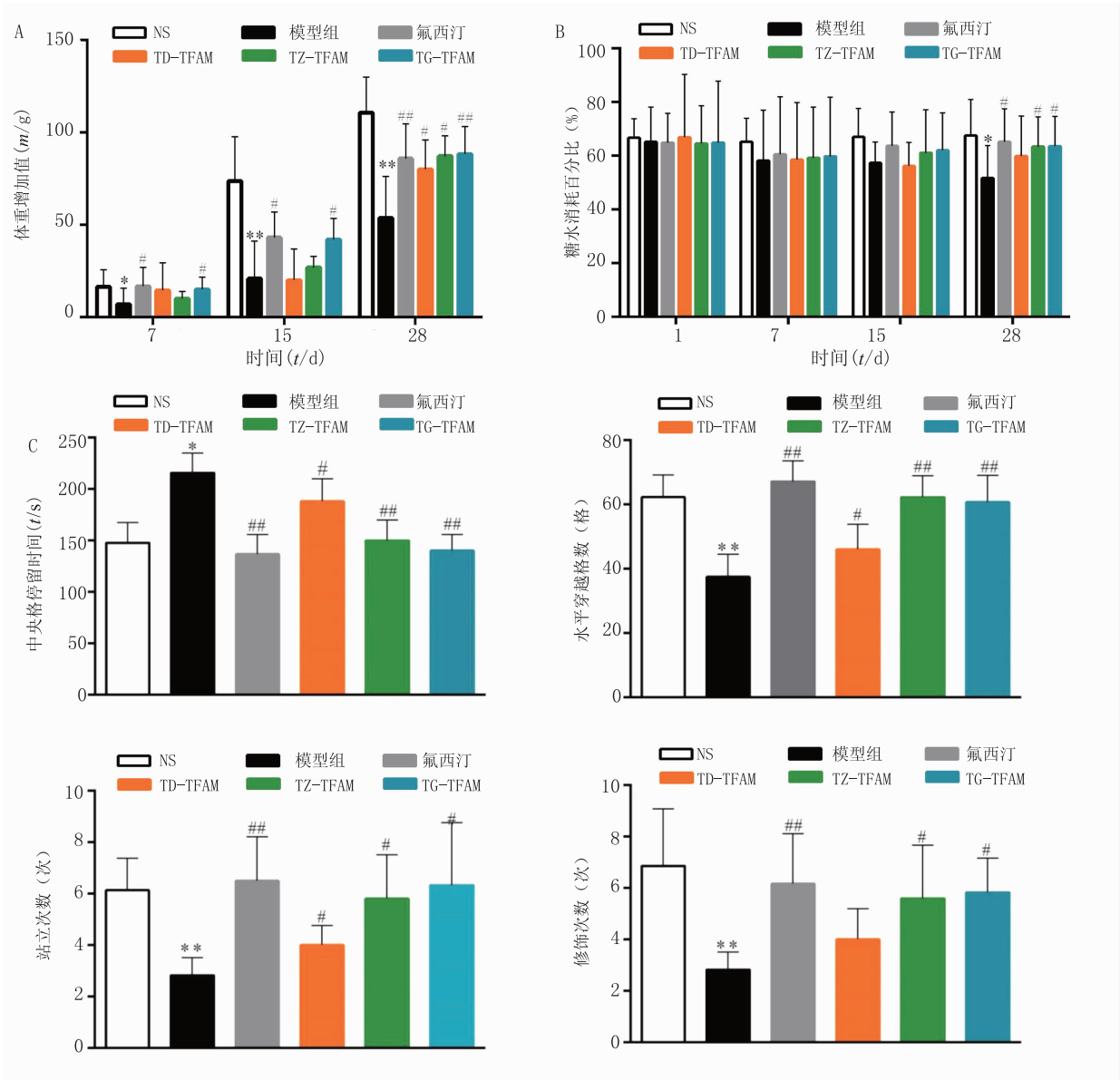


图 1 TFAM 对 CUMS 大鼠行为学的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

A. TFAM 对 CUMS 大鼠体重增加值的影响; B. TFAM 对 CUMS 大鼠糖水消耗百分比的影响; C. TFAM 对 CUMS 大鼠旷场实验的影响  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与 NS 组比较; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与模型组比较

#### 3.2 TFAM 对脑内单胺类递质 5-HT、NA 的影响

图 2 显示,TFAM 对两种单胺递质的影响相近。与 NS 组比较,模型组 5-HT、NA 含量在海马和皮层中均显著减少( $P < 0.01$ );与模型组相比,除 TD-TFAM

组海马中 NA 含量、皮层中 5-HT 和 NA 含量无显著差异变化外,其余各组的变化均有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。由图 2 结果可见,TFAM 可能是通过影响大鼠脑内单胺递质的释放来发挥抗抑郁作用的。

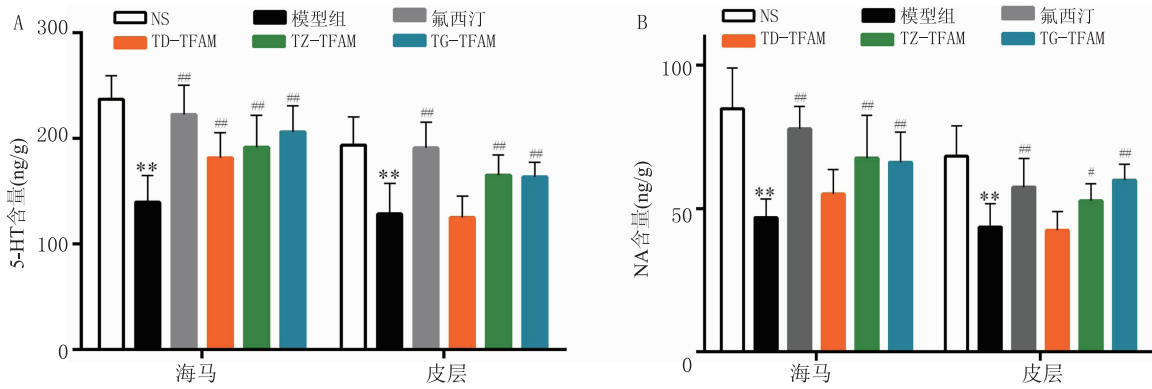


图2 CUMS大鼠脑区单胺递质含量比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

A. TFAM对CUMS大鼠脑内5-HT含量的影响; B. TFAM对CUMS大鼠脑内NA含量的影响

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与NS组比较; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与模型组比较

### 3.3 TFAM对HPA轴激素ACTH、CORT的影响

图3显示, NS组和模型组比较, 大鼠海马和皮层中ACTH、CORT含量均具有显著性差异( $P < 0.01$ );

与模型组相比, 除TD-TFAM组大鼠皮层ACTH含量无显著性差异( $P > 0.05$ )外, 其余各组ACTH、CORT含量均显著减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。

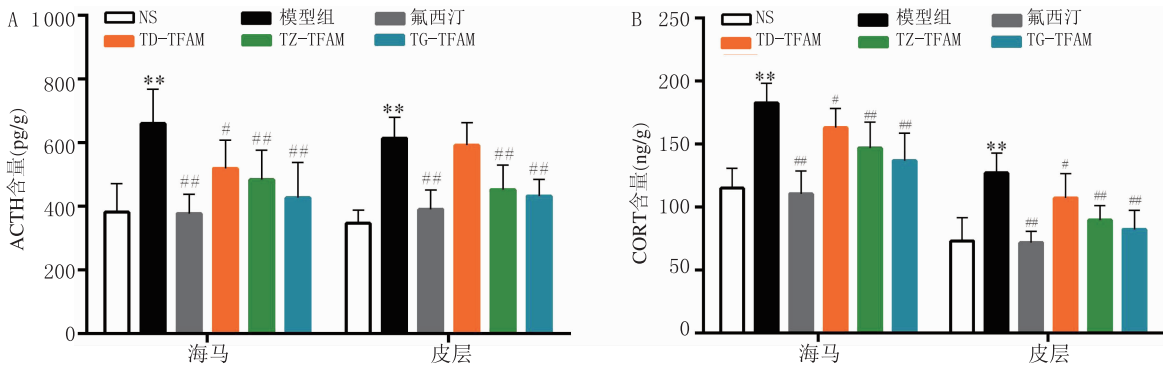


图3 CUMS大鼠脑区HPA轴激素含量比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

A. TFAM对CUMS大鼠脑内ACTH含量的影响; B. TFAM对CUMS大鼠脑内CORT含量的影响

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与NS组比较; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与模型组比较

### 3.4 TFAM对SOD、GSH-Px酶活性的影响

图4显示, 与NS组比较, 模型组血清和纹状体中SOD、GSH-Px含量均显著降低; 与模型组相比, SOD含量在阳性对照组、TZ-TFAM和TG-TFAM

组大鼠血清和纹状体增高显著, GSH-Px含量在两种组织中的变化仅TG-TFAM组变化显著, 以上结果提示TFAM对氧化应激有影响, 这种影响存在一定的剂量依赖性。

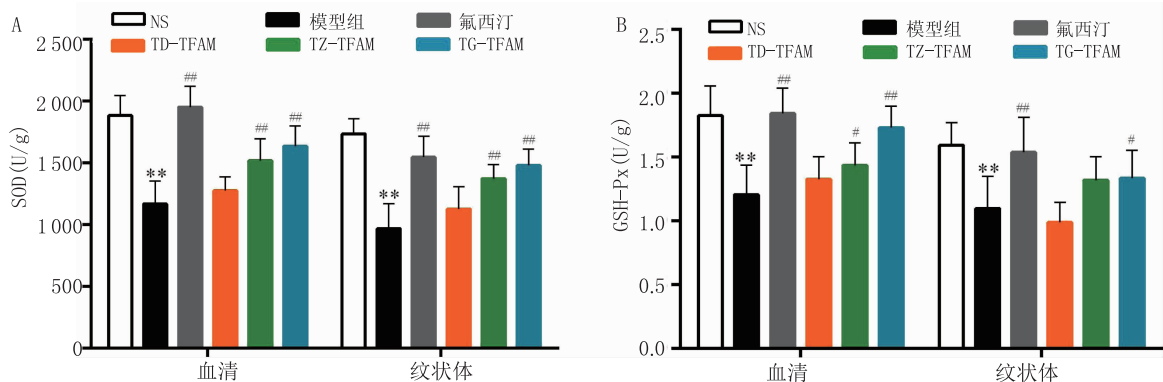


图4 CUMS大鼠血清和纹状体SOD、GSH-Px活性比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

A. TFAM对CUMS大鼠血清和纹状体SOD的影响; B. TFAM对CUMS大鼠血清和纹状体GSH-Px的影响

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与NS组比较; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与模型组比较

#### 4 讨论

CUMS模型是目前应用最为广泛的经典抑郁症模型<sup>[10-12]</sup>,本研究通过28 d一系列温和随机刺激建立抑郁动物模型。实验中模型组大鼠体重增长缓慢,糖水偏好明显下降,自主活动也大幅降低,表明多种刺激下造模成功。行为学的测评是评估抗抑郁作用的重要指标<sup>[13-14]</sup>,一定治疗剂量的TFAM可明显改善CUMS大鼠的抑郁动物行为,可见TFAM对于治疗大鼠抑郁具有一定作用。

有研究表明抑郁症与脑内5-HT等单胺类神经递质缺陷有关<sup>[15-17]</sup>,调节脑内突触的单胺类神经递质浓度则能够缓解抑郁症状<sup>[18-19]</sup>。氟西汀是5-HT摄取抑制剂,其通过调节脑内5-HT含量而发挥抗抑郁作用,是经典的抗抑郁化学药物<sup>[14]</sup>。本研究发现TFAM可以显著提高CUMS大鼠海马和皮层中5-HT、NA的含量,且TG-TFAM组作用与氟西汀组相当,因此,可以推断TFAM对抑郁模型大鼠的治疗作用可能与调节脑内单胺类递质有关。

临床研究认为长期处于应激刺激状态的抑郁症患者的下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴功能亢进<sup>[20]</sup>,从而使ACTH和CORT分泌增加<sup>[20]</sup>,进而损伤海马神经元造成机体情绪低下、失眠、认知功能下降。多项研究表明通过调节HPA功能可改善CUMS大鼠的抑郁症状<sup>[21-22]</sup>。本研究的结果显示TFAM可显著降低CUMS大鼠海马和皮层中ACTH和CORT的表达水平,通过减少这两种激素对HPA轴上组织结构的损伤而发挥抗抑郁作用。

氧化应激损伤会引发各种精神疾病,也参与了抑郁症的发生发展<sup>[23-24]</sup>。SOD是体内O<sup>2-</sup>清除因子,它可以把有害的O<sup>2-</sup>转化为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和O<sub>2</sub>,再通过GSH-Px的作用进一步还原成水和无毒物质,同时GSH-Px还可清除脂质过氧化物,故二者活性的升高有利于减少脂质过氧化作用对神经系统的损伤<sup>[25]</sup>。本研究发现TFAM各剂量组均能不同程度地提高CUMS模型大鼠血清和纹状体中SOD和GSH-Px活性,提示TFAM的抗抑郁作用可能与改善氧化应激有关。

综上,TFAM可改善CUMS大鼠的抑郁症状,其作用可能与促进脑内单胺类递质释放、调节HPA轴功能及改善氧化应激有关,其作用机制具有多维度、多靶点的特点,这将为开发有效抗抑郁天然药物提供更多有力证据。

#### 【参考文献】

[1] ALEMAN A, DENYS D. Mental health: a road map for suicide research and prevention[J]. Nature, 2014, 509(7501): 421-423.

[2] 慕磊, 孙建绪. 抑郁症发病机制与抗抑郁药物作用靶标[J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42(4): 463-466.

[3] 龚金炎, 吴晓琴, 毛建卫, 等. 黄酮类化合物抗抑郁作用的研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(1): 195-200.

[4] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 735.

[5] 张清华, 张玲, 尚立霞, 等. 白梅花的化学成分研究[J]. 中药材, 2008, 31(11): 1666-1668.

[6] 高洪元, 田青. 佛手挥发油的抗抑郁作用机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 231-234.

[7] 陈明珠, 陈静, 黄幼霞, 等. AB-8型大孔吸附树脂分离纯化绿萼梅总黄酮[J]. 海峡药学, 2017, 29(2): 38-41.

[8] 游杰舒, 张瑞睿, 郭建友, 等. 哈蟆油石油醚提取物的抗抑郁作用及其机制[J]. 中草药, 2013(19): 2717-2721.

[9] 徐颖, 冯洁, 郭建友. 枳壳提取物抗抑郁作用及其机制探讨[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(10): 1086-1092.

[10] 李连玲, 刘晓丽, 袁靖姣, 等. 抑郁模型的研究进展[J]. 中国健康心理学杂志, 2014(10): 1588-1590.

[11] 李晓秋, 许晶. 抑郁动物模型的研究进展[J]. 中华精神科杂志, 2002, 35(3): 184-186.

[12] 韩晓蕾, 胡风云, 田峰, 等. 抑郁动物模型的研究进展及评价[J]. 临床医药实践, 2015, 24(7): 533-536.

[13] 沈双宏, 胡随瑜, 唐凤英, 等. 复方刺蒺藜苷对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及海马CNTF表达的影响[J]. 中国临床心理学杂志, 2006, 14(3): 278-280.

[14] 孙达亮, 李雪, 刘庆贺. 电针结合氟西汀对抑郁模型大鼠行为学及HPA轴的影响[J]. 精神医学杂志, 2016, 29(1): 4-8.

[15] 张峰, 曹仲伟, 张学杰, 等. 柴胡对大鼠慢性应激抑郁模型脑单胺类神经递质及其代谢物含量的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(3): 224-226.

[16] 李红娅, 石延榜, 蒋艳玲. 丹栀逍遥散胶囊对慢性应激抑郁模型下丘脑单胺类神经递质的影响[J]. 中国医药导报, 2007, 4(30): 61-62.

[17] 唐卓君, 邹伟. 抗抑郁药的研究进展[J]. 四川精神卫生, 2014(6): 569-570.

[18] 叶光明, 姜云云, 瞿发林, 等. 抗抑郁药的研究进展[J]. 中国药师, 2006(10): 954-956.

[19] 曹莉莎, 叶云, 罗文, 等. 抗抑郁药物作用靶点的研究进展[J]. 中国药房, 2014(13): 1227-1231.

[20] 呼日乐巴根, 松林, 阿拉木斯, 等. 肉苁蓉-5味丸对慢性抑郁模型大鼠血清ACTH和CORT含量的影响[J]. 中国民族医药杂志, 2015, 21(3): 47-49.

[21] 武丽, 张丽萍, 陈贵海, 等. 解郁1号对抑郁大鼠血浆促肾上腺皮质激素释放因子和皮质醇含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 58-60.

[22] 付晓菲, 徐风华, 陈建, 等. 酰米菲肽对慢性应激模型大鼠的抗抑郁作用[J]. 军事医学, 2014, 38(4): 281-284.

[23] VAVAKOVA M, DURACKOVA Z, TREBATICKA J. Markers of oxidative stress and neuroprogression in depression disorder[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 898393.

[24] 王玉龙, 刘廷毅, 董海燕, 等. 抑郁模型大鼠大脑和结肠中SOD、MDA和NO含量的异常[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2005, 14(7): 627-628.

[25] 邱海鹏, 张晓璇, 申兴斌, 等. 补肾益智方联合丁苯酞对阿尔茨海默病患者Aβ、GSH-Px、SOD及MDA水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(14): 187-191.

【收稿日期】 2018-06-28 【修回日期】 2019-01-20

【本文编辑】 李睿昊