

补骨脂素抗抑郁作用及机制研究

杨伊姝 刘占东 张树成 石翠格

100050 首都医科大学附属北京友谊医院医保神经内科(杨伊姝、刘占东); 100081 北京, 国家卫生计生委科学技术研究所(张树成、石翠格)

通信作者: 石翠格, Email: yushuiyushui@sina.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2018.05.002

【摘要】目的 研究补骨脂素的抗抑郁作用及机制。**方法** 采用大鼠强迫游泳、小鼠强迫游泳及小鼠悬尾3种抑郁模型,将动物随机分为对照组、补骨脂素低剂量组、补骨脂素高剂量组、阿米替林组,观察各组药物对大/小鼠强迫游泳不动时间和悬尾不动时间的影响;同时在细胞水平建立皮质酮损伤PC12细胞模型,观察补骨脂素的细胞保护作用。**结果** 在大/小鼠强迫游泳和小鼠悬尾实验中,补骨脂素可显著缩短大/小鼠的强迫游泳不动时间和悬尾不动时间,与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);皮质酮损伤PC12细胞模型中,补骨脂素显著提高PC12细胞的存活率,拮抗皮质酮诱导的细胞损伤作用。**结论** 补骨脂素具有抗抑郁效应,其机制可能与神经细胞保护作用相关。

【关键词】 抑郁; 补骨脂素; 神经保护; 皮质酮

基金项目: 国家卫生计生委科研所科技创新基金项目(2017GJM02)

Study on the anti-depressant effect of psoralen and its mechanism Yang Yishu, Liu Zhandong, Zhang Shucheng, Shi Cuige

Neurology Department, Medical Healthcare Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China(Yang YS, Liu ZD); Department of Cell Biology, National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China(Zhang SC, Shi CG)

Corresponding author: Shi Cuige, Email: yushuiyushui@sina.com

【Abstract】Objective To investigate the anti-depressant effects of psoralen and its mechanisms. **Methods** The anti-depressant effects of psoralen were evaluated by the forced swimming tests in rats and mice and the tail suspension test in mice. The animals were randomly divided into four groups: control group, low dose psoralen group, high dose psoralen group and amitriptyline group. The effects of psoralen on immobility time were measured in the forced swimming test and tail suspension test in rats and mice. Likewise, PC12 cells injury was induced by corticosterone and the effects of psoralen on the cell viability were measured by MTT assay. **Results** Psoralen significantly decreased the immobility time in the forced swimming tests and tail suspension test in rats and mice, which were significantly different compared with the control group ($P < 0.05$). In addition, psoralen could improve the survival rate of PC12 cells injured by corticosterone. **Conclusions** Psoralen has anti-depressant effects and its mechanisms may be involved in the protective effects of neural cells.

【Key words】 Depression; Psoralens; Neuroprotective; Corticosterone

Fund program: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (2017GJM02)

随着现代生活节奏日益加快,生存压力与日俱增,抑郁症发病率逐年上升。2017年WHO发布最新报告,全球抑郁症患者目前约为3.22亿,患病率为4.4%,而我国抑郁症的患病率亦高达4.2%^[1]。抑郁症以显著持久的心境低落为主要临床特征,严重影响患者生活质量,部分患者甚至可出现自伤、自杀行为;而且缓解后极易复发,不易根治,给个人、家庭和社会均造成极大负担。抑郁症的病因尚不完全明

确,可能为应激与遗传、环境因素交互作用所致。

大量研究表明,心理应激事件与抑郁症密切相关,经历严重创伤事件后抑郁症发生概率可高达78%。若个体长期遭受强烈身心应激可持续激活交感神经系统下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴),使肾上腺皮质激素呈亢进状态,最终导致抑郁症发生^[2-3]。我们曾以大/小鼠强迫游泳实验和小鼠悬尾实验诱导急性应激抑郁模型,并通过高浓度皮质酮损伤PC12

神经细胞,进一步观察到中药淫羊藿苷对损伤的PC12细胞具有保护作用,并改善动物行为,发挥了良好的抗抑郁效果^[4]。近期有研究发现,中药补骨脂素对H₂O₂诱导的PC12细胞损伤同样具有保护作用^[5],因此,我们拟采用类似方法观察评估中药补骨脂素的抗抑郁活性。

材料与方 法

1.材料与动物:(1)实验材料。补骨脂素购自上海晶都生物技术有限公司(规格:HPLC ≥ 98%, 20 mg/支;货号:JD-16890),阿米替林为湖南洞庭药业股份有限公司产品(规格:25 mg/片;批号:B130537),皮质酮购自Sigma公司(规格:1 g;货号:C2775)。(2)实验动物。雄性SD大鼠,体重180~220 g, 40只;雄性C57小鼠,体重18~22 g, 80只。大/小鼠均购自维通利华实验动物中心。

2.方法:(1)大鼠强迫游泳实验。随机将40只SD大鼠分为4组(每组10只):对照组;补骨脂素10 mg/kg组;补骨脂素20 mg/kg组;阿米替林5 mg/kg组。每只大鼠灌胃给药,对照组给予等体积生理盐水,1 h后,将大鼠放入圆柱形玻璃缸中(内径20 cm,高40 cm,水深24 cm,水温28~29℃),计算大鼠5 min在水中的不动时间^[6]。不动的判定标准为:大鼠浮在水面,只限于作维持身体平衡并将头部露出水面的微小动作。(2)小鼠强迫游泳实验。随机将40只C57小鼠分为4组(每组10只):对照组;补骨脂素6 mg/kg组;补骨脂素12 mg/kg组;阿米替林5 mg/kg组。每只小鼠灌胃给药,对照组给予等体积生理盐水,1 h后,将小鼠放入圆柱形玻璃缸中(内径10 cm,高20 cm,水深10 cm,水温25℃),计算小鼠4 min在水中的不动时间^[7]。判定不动的标准:小鼠在水中停止挣扎,或呈漂浮状态,仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面。(3)小鼠悬尾实验。随机将40只C57小鼠分为4组(每组10只):对照组;补骨脂素6 mg/kg组;补骨脂素12 mg/kg组;阿米替林5 mg/kg组。每只小鼠灌胃给药,对照组给予等体积生理盐水,1 h后,将尾部距末端2 cm处固定倒悬于20 cm × 25 cm × 25 cm的箱内,小鼠头部距离箱底约10 cm,悬挂6 min,计算后4 min内的不动时间^[8]。判定不动标准:小鼠在空中停止挣扎,身体呈垂直倒悬状,静止不动。(4)皮质酮诱导PC12细胞损伤模型。PC12细胞悬液以DMEM培养液(含10%胎牛血清,青霉素钠200 U/ml,链霉素100 μg/ml, pH=7.4)稀释至2 × 10⁵个细胞/ml,96孔培养板接种,每孔

100 μl,置于37℃、5%CO₂孵箱孵育。细胞长满孔底,弃去细胞液,加入含有0.2 μmol/L皮质酮的培养液,孵育24 h,弃去培养液,每孔加入含0.5 g/L MTT的无血清DMEM,孵育4 h弃去DMEM,每孔加入100 μl二甲基亚砷(DMSO)。蓝色颗粒全部溶解时,以酶标仪测定标本在570 nm波长处的吸光度(A)值,计算细胞存活率^[9]。计算方法为:细胞存活率(%)=(实验组A值/对照组A值) × 100%。实验分组如下:①对照组:弃去原细胞培养液,加入完全培养基;②皮质酮组:弃去原细胞培养液,加入含0.2 μmol/L皮质酮的完全培养基;③补骨脂素组:弃去原细胞培养液,加入含0.2 μmol/L皮质酮的完全培养基,同时分别加入终浓度为1 μmol/L, 10 μmol/L和100 μmol/L的补骨脂素;④阿米替林组:弃去原细胞培养液,加入含0.2 μmol/L皮质酮的完全培养基,同时加入10 μmol/L阿米替林。

3.统计学方法:采用SPSS 19.0软件对数据进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用独立样本t检验,各实验组均数与对照组均数比较采用方差分析中的Dunnett-t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.补骨脂素缩短大鼠游泳不动时间:见表1。大鼠强迫游泳实验结果显示,与对照组比较,5 mg/kg阿米替林可显著缩短大鼠强迫游泳不动时间($P < 0.01$);而10 mg/kg及20 mg/kg两种剂量的补骨脂素同样可以缩短大鼠强迫游泳不动时间,两剂量组与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2.补骨脂素缩短小鼠游泳不动时间和悬尾不动时间:见表1。小鼠强迫游泳实验研究表明,与对照组比较,5 mg/kg阿米替林显著缩短小鼠强迫游泳不动时间($P < 0.01$);应用6 mg/kg低剂量补骨脂素未能明显缩短小鼠强迫游泳不动时间,而12 mg/kg高剂量补骨脂素可显著缩短小鼠强迫游泳不动时间($P < 0.05$)。

表1 补骨脂素对大、小鼠运动的影响($s, \bar{x} \pm s$)

组别	大鼠强迫游泳 不动时间	小鼠强迫游泳 不动时间	小鼠悬尾 不动时间
对照组	125 ± 22	113 ± 23	102 ± 23
补骨脂素低剂量组	90 ± 22 ^a	95 ± 22	82 ± 19
补骨脂素高剂量组	82 ± 21 ^a	88 ± 20 ^b	74 ± 18 ^a
阿米替林组	70 ± 17 ^a	78 ± 18 ^a	56 ± 17 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;各组与对照组比较采用Dunnett-t检验

小鼠悬尾实验研究表明,与对照组比较,5 mg/kg 阿米替林显著缩短小鼠倒悬后不动时间($P < 0.01$);应用6 mg/kg 低剂量补骨脂素未能明显缩短小鼠悬尾不动时间,而12 mg/kg 高剂量补骨脂素可显著缩短小鼠悬尾不动时间($P < 0.01$)。

3. 补骨脂素对PC12细胞的保护作用:见表2。结果显示,皮质酮组A570较对照组显著减低($P < 0.01$)而10 $\mu\text{mol/L}$ 和100 $\mu\text{mol/L}$ 补骨脂素组及10 $\mu\text{mol/L}$ 阿米替林组A570较皮质酮组均显著增高($P < 0.05$)。

表2 补骨脂素对皮质酮诱导的PC12细胞损伤的保护作用

组别	A570	存活率(%)
对照组	1.33 ± 0.22	100.0
皮质酮组	0.84 ± 0.21 ^a	63.2
1 $\mu\text{mol/L}$ 补骨脂素组	0.91 ± 0.19	68.4
10 $\mu\text{mol/L}$ 补骨脂素组	1.08 ± 0.19 ^b	81.2
100 $\mu\text{mol/L}$ 补骨脂素组	1.19 ± 0.21 ^a	89.5
10 $\mu\text{mol/L}$ 阿米替林组	1.22 ± 0.20 ^a	91.7

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;皮质酮组与对照组比较采用独立样本 t 检验;各补骨脂素组与对照组比较采用Dunnett- t 检验

讨 论

近年随着社会生活压力不断增加,抑郁症呈现高发态势,目前其神经生物学发病机制尚未阐明,认为与神经内分泌系统、单胺类神经递质系统、神经营养因子和成年神经再生、神经免疫系统及表观遗传修饰等多因素相关,可能在某些应激刺激诱发下遗传与环境因素共同作用所致。因此,抑郁模型主要包括应激模型、损伤模型、化学诱导模型及转基因模型^[10]。大/小鼠强迫游泳实验和小鼠悬尾实验均为经典的应激模型,让大/小鼠接受无法控制或逃避的厌恶性刺激,继而引发逃避行为欠缺及运动活性降低的“无助”行为,“无助”同时可伴有食欲减退、体重减轻及攻击性降低等,符合疾病的病理生理特征;应激刺激可导致单胺类神经递质系统发生显著改变,诱发5-羟色胺(5-HT)及去甲肾上腺素(NE)释放减少,多巴胺(DA)信号传导降低,符合疾病的病理生理机制^[11]。目前,大/小鼠强迫游泳实验和小鼠悬尾实验广泛应用于抗抑郁药物的筛选评价。

本研究结果表明,与对照组相比补骨脂素可显著缩短大/小鼠的强迫游泳不动时间和小鼠悬尾不动时间,显示了与阳性对照阿米替林类似的抗抑郁效应。

Xu等^[12]曾在小鼠强迫游泳实验中观察到补骨脂素的抗抑郁效应,认为补骨脂素可显著逆转强迫游泳所诱导的小鼠额叶皮质和海马5-HT及5-羟色胺(5-HIAA)的含量变化;而且可降低强迫游泳所促发的血清促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)和皮质酮浓度的升高,从而使HPA轴活性恢复正常。

研究发现,慢性皮质酮注射可诱导小鼠抑郁样行为^[13],持续高浓度皮质酮可诱导淋巴细胞、皮层及海马神经细胞损伤^[14]。PC12细胞是大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤分化细胞株,具有神经内分泌细胞的一般特征,广泛应用于神经生理和神经药理学研究,故我们选用皮质酮诱导PC12细胞损伤,观察补骨脂素的细胞保护作用。研究结果显示,一定浓度的补骨脂素可使PC12细胞存活率显著提高,逆转皮质酮诱导的细胞损伤,具有神经细胞保护作用。

补骨脂是豆科草本植物补骨脂*Psoralea corylifolia* L.的干燥成熟果实,结构多样,药理活性广泛,近年研究发现补骨脂具有雌激素样、抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等多种活性,同时有研究显示补骨脂中的呋喃香豆素类化合物(补骨脂素)可能具有一定的抗抑郁活性^[15]。应激信号沿中枢神经系统到达下丘脑室旁核,促进其分泌促肾上腺皮质激素释放激素(CRH),随后CRH引发垂体前叶释放促肾上腺皮质激素(ACTH),后者诱发糖皮质激素(在人体为皮质醇,啮齿类动物体内为皮质酮)分泌,进一步激活交感神经系统HPA轴;持续的应激刺激导致HPA轴功能亢进,引发抑郁症。本研究通过强迫游泳实验和悬尾实验给予大/小鼠应激刺激,出现上述病理生理改变,而补骨脂素有效逆转了这一过程,且对皮质酮诱导的细胞损伤具有显著保护作用,推测其药理机制为拮抗HPA轴功能亢进,改善抑郁症状;此外,研究表明补骨脂素尚可抑制单胺氧化酶活性,减少脑内5-HT及NE降解,使神经细胞突触间隙5-HT和NE浓度增加,发挥抗抑郁效应。

大量研究证实,补骨脂具有多重药理作用,药用价值极高,但对于其抗抑郁效应及其机制的研究尚需进一步深入,从而为抗抑郁中药研发提供相关的理论指导。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 构思与设计为石翠格,资料收集、数据分析为杨伊姝、刘占东,研究实施为石翠格、张树成、杨伊姝,论文撰写为杨伊姝,论文修订审校为石翠格

参 考 文 献

- [1] World Health Organization (WHO). Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization 2017; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [2] Van Dusen JP, Tihamiy MF, Kashdan TB, et al. Gratitude, depression and PTSD: Assessment of structural relationships [J]. Psychiatry Res, 2015, 230(3): 867-870. DOI: 10.1016/j.psychres.2015.11.036.
- [3] 何海然, 薛占霞. 抑郁症相关发病机制的研究进展 [J]. 神经药理学报, 2016, 6(2): 20-25. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1396.2016.02.004.
He HR, Xue ZX. Research Progress in the Pathogenesis of Depression [J]. Acta Neuropharmacologica, 2016, 6(2): 20-25.
- [4] 石翠格, 李慧, 王丽丽, 等. 淫羊藿苷抗抑郁及对皮质酮致 PC12 细胞损伤的保护作用研究 [J]. 中国药物应用与监测, 2013, 10(5): 268-270. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8157.2013.05.009.
Shi CG, Li H, Wang LL, et al. Evaluation of antidepressant effect and protective effect against corticosterone-induced PC12 cell injury of icariin [J]. Chinese Journal of Drug Application and Monitoring, 2013, 10(5): 268-270.
- [5] 管宇航, 海舰. 补骨脂素对 H2O2 诱导 PC-12 细胞损伤的保护作用 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(5): 577-581. DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.05.003.
Guan YH, Hai J. Protection of psoralen on PC-12 cell damage induced by H2O2 [J]. Drugs & Clinic, 2016, 31(5): 577-581.
- [6] Al-Rahbi B, Zakaria R, Muthuraju S, et al. Preliminary study: effects of social instability stress on depressive behaviours in ovariectomised rats [J]. Malays J Med Sci, 2013, 20(2): 35-40.
- [7] Mello BS, Monte AS, McIntyre RS, et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration [J]. J Psychiatr Res, 2013, 47(10): 1521-1529. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2013.06.008.
- [8] Yi LT, Li J, Liu BB, et al. Screening of the antidepressant-like effect of the traditional Chinese medicinal formula Si-Ni-San and their possible mechanism of action in mice [J]. Pharmacognosy Res, 2013, 5(1): 36-42. DOI: 10.4103/0974-8490.105647.
- [9] Wu F, Li H, Zhao L, et al. Protective effects of aqueous extract from Acanthopanax senticosus against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(3): 861-868. DOI: 10.1016/j.jep.2013.05.026.
- [10] 罕园园, 代解杰. 抑郁症动物模型与其发病机制研究的进展 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3): 321-326. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.020.
Han YY, Dai JJ. Research progress in animal models and mechanism of depression [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2016, 24(3): 321-326.
- [11] Vollmayr B, Gass P. Learned helplessness: unique features and translational value of a cognitive depression model [J]. Cell Tissue Res, 2013, 354(1): 171-178. DOI: 10.1007/s00441-013-1654-2.
- [12] Xu Q, Pan Y, Yi LT, et al. Antidepressant-like effects of psoralen isolated from the seeds of Psoralea corylifolia in the mouse forced swimming test [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(6): 1109-1114.
- [13] 张绘宇, 赵玉男, 王中立. 慢性皮质酮注射对小鼠抑郁样行为及脑糖原水平的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(5): 828-833. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2015.05.011.
Zhang HY, Zhao YN, Wang ZL. Influence of chronic corticosterone injection on depression-like behavior and brain glycogen levels in mice [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2015, 31(5): 828-833.
- [14] Wu TC, Chen HT, Chang HY, et al. Mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents chronic corticosterone induced depression-like behavior [J]. Psychoneuroendocrinology, 2013, 38(6): 871-883. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2012.09.011.
- [15] 陈莹, 吴玥, 宋金春. 补骨脂化学成分及生物活性研究进展 [J]. 实用药物与临床, 2016, 19(9): 1184-1188. DOI: 10.14053/j.cnki.pper.201609033.
Chen Y, Wu Y, Song JC. Research progress of the chemical constituents and bioactivity of Psoralea corylifolia [J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies, 2016, 19(9): 1184-1188.

(收稿日期: 2018-04-07)

(本文编辑: 赵静姝)