

· 药效与毒理学研究 ·

栀子提取物 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠的作用及机制研究

李方园, 盛婵娟, 袁方玉, 鞠程, 尚俊美, 鲍秀琦, 张丹(中国医学科学院, 北京协和医学院药物研究所天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: **目的** 探讨栀子提取物 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠的作用及机制。**方法** 将 ICR 小鼠随机分为正常对照组、模型组(利血平组)、氟西汀组(阳性药组, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)及 GJ-4 低、中、高剂量组(25 、 50 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 17 只; 灌胃给药, 每日 1 次, 连续 14 d。灌胃给药 30 min 后, 采用腹腔注射利血平($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)复制抑郁症小鼠模型。采用观察眼睑下垂程度、旷场实验、悬尾实验、糖水偏好实验等行为学方法评价小鼠的抑郁状态; 采用荧光法测定小鼠脑皮层单胺氧化酶 A(MAO-A)的含量; 高效液相色谱-电化学检测法测定小鼠脑皮层内单胺类神经递质[多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、高香草酸(HAV)、二羟基苯乙酸(DOPAC)、5-羟色胺(5-HT)]的含量。**结果** 与正常对照组比较, 模型组小鼠的眼睑下垂程度评分明显提高($P < 0.001$); 运动功能明显受到抑制, 走出格子的潜伏期明显延长($P < 0.001$), 通过格子数明显减少($P < 0.001$); 悬尾 6 min 内的不动时间显著增加($P < 0.001$); 糖水偏好系数明显降低, 糖水的消耗量明显下降($P < 0.001$); 小鼠脑皮层内 MAO-A 的含量明显上升($P < 0.001$), DA、DOPAC、5-HT、HAV 含量均明显下降($P < 0.01$, $P < 0.001$)。与模型组比较, 各给药组小鼠眼睑下垂程度评分明显降低($P < 0.001$); GJ-4 中、高剂量组小鼠走出格子的潜伏期明显缩短($P < 0.001$), GJ-4 高剂量组小鼠通过的格子数明显增加($P < 0.05$); 各给药组小鼠的悬尾不动时间明显缩短($P < 0.001$); GJ-4 低、中、高剂量组小鼠的糖水偏好系数明显升高, 糖水消耗量明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$); GJ-4 高剂量组小鼠脑皮层内 MAO-A 的含量明显降低($P < 0.001$), DOPAC、5-HT 含量明显升高($P < 0.01$, $P < 0.001$)。**结论** GJ-4 对利血平致抑郁症模型小鼠具有明显的抗抑郁活性, 其机制可能与抑制脑内 MAO-A 的活性, 增加脑内 5-HT 和 DOPAC 的含量有关。

关键词: 栀子提取物 GJ-4; 利血平; 抑郁症; 小鼠; 单胺氧化酶 A; 单胺类递质; 5-羟色胺; 二羟基苯乙酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)06-0751-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.06.001

Pharmacodynamics and Mechanistic Study of Gardeniae Fructus Extract GJ-4 on Depressed Mice Induced by Reserpine

LI Fangyuan, SHENG Chanjuan, YUAN Fangyu, JU Cheng, SHANG Junmei, BAO Xiuqi, ZHANG Dan(State Key Laboratory of Natural Products and Functions, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of Gardeniae fructus extract GJ-4 on reserpine induced depression mice. **Methods** ICR mice were randomly divided into control group, model group (reserpine group), fluoxetine group (positive group, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), GJ-4 low-dose, medium-dose and high-dose groups (25 , 50 , $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 17 mice in each group. The drugs were given by gavage once a day for consecutive 14 days.

收稿日期: 2020-10-13

作者简介: 李方园, 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经药理学。Email: lifangyuan@imm.ac.cn。通信作者: 张丹, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向: 神经药理学。Email: danzhang@imm.ac.cn。

基金项目: 医科院创新工程重大协同创新项目(500104122); 国家自然科学基金资助项目(81630097, 81773718); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目(2016-I2M-3-011); 重大新药创制科技重大专项“十三五”计划项目(2018ZX09711001-003-020, 2018ZX09711001-003-005, 2018ZX09711001-008-005); 中国医学科学院中央高校基本科研业务费项目(2018RC35002)。

30 min after intragastric administration, reserpine ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was injected intraperitoneally to establish depressed mice model. The depression status of mice was evaluated by observing the blepharoptosis, open field test, tail suspension test, sugar water preference test and other behavioral methods. The content of monoamine oxidase A (MAO-A) in the cerebral cortex of mice was determined by fluorescence method. The contents of monoamine neurotransmitters dopamine (DA), norepinephrine (NE), vanillic acid (HAV), dihydroxy phenylacetic acid (DOPAC), 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the cerebral cortex of mice were determined by high performance liquid chromatography combined with electrochemical method. **Results** Compared with control group, the score of blepharoptosis in model group was significantly increased ($P < 0.001$). The motor function was significantly injured, the latency of getting out of the cell was significantly prolonged ($P < 0.001$), and the number of cells passed was significantly decreased ($P < 0.001$). The immobility time within 6 min of tail suspension was significantly increased ($P < 0.001$). The sugar water preference coefficient was significantly decreased, and the consumption of sugar water was significantly decreased ($P < 0.001$). The content of MAO-A in cerebral cortex of mice was significantly increased ($P < 0.001$), while the contents of DA, DOPAC, 5-HT and HAV were significantly decreased ($P < 0.01$, $P < 0.001$). Compared with model group, blepharoptosis scores of the mice in each dose group of GJ-4 was significantly decreased ($P < 0.001$). The latency of getting out of the cell in GJ-4 high and medium dose groups was significantly shortened ($P < 0.001$), and the number of cells passed by GJ-4 high dose group mice was significantly increased ($P < 0.05$). The immobility time of suspended tail test of mice in all dose groups of GJ-4 was significantly shortened ($P < 0.001$), and the sugar water preference coefficient and sugar water consumption were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). The content of MAO-A in cerebral cortex of mice in GJ-4 high-dose group significantly decreased ($P < 0.001$), while the contents of DOPAC and 5-HT were significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** GJ-4 showed significant antidepressant activity on depressed mice induced by reserpine, which might be through inhibiting the activity of MAO-A and increasing the 5-HT and DOPAC concentrations in the cortex of mouse brain.

Keywords: Gardeniae fructus extract GJ-4; reserpine; depression; mice; monoamine oxidase A; monoamine transmitters; 5-hydroxytryptamine (5-HT); dihydroxy phenylacetic acid (DOPAC)

抑郁症 (Depression) 是一种以显著而持久的情绪低落为主要精神症状, 以言语减少、食欲减退、行动迟缓为主要行为特征的临床综合征, 严重的患者甚至有自杀倾向。抑郁症的发病原因包括神经内分泌、神经免疫、社会心理因素和遗传因素等。世界卫生组织 (WHO) 2017 年的统计数据^[1]显示, 全球抑郁症发病人数约 3.22 亿, 且发病率逐年增加, 抑郁症已成为严重威胁人类身心健康的杀手。目前抑郁症以药物治疗为主, 但存在起效缓慢、生物利用率低等问题, 还可能引发不良反应。因此, 开发选择性高、靶点明确、不良反应小的新型药物成为目前抗抑郁药物研发的目标。

GJ-4 是从中药栀子中提取的藏红花色素富集部位, 前期研究^[2-4]表明, GJ-4 可改善痴呆小鼠的学习记忆障碍, 提高其学习记忆能力, 可能与其抑制神

经炎症和保护神经元的作用有关。抑郁症与痴呆之间关系密切, 痴呆患者常伴有抑郁症状, 抑郁是早期认知缺陷的反应, 抑郁也可损伤认知功能导致痴呆, 因此抑郁可能是痴呆的危险因素^[5]。由此, 推测 GJ-4 可能对抑郁症也具有治疗作用。故本研究拟利用腹腔注射利血平建立小鼠抑郁症模型, 探讨 GJ-4 对抑郁症的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性 ICR 小鼠, SPF 级, 102 只, 体质量 22~25 g, 购自北京华阜康生物科技有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2014-0004, 动物质量合格证号: 110322201101520028。动物于屏障级 SPF 动物房饲养盒内常规饲养, 自由进食进水。

1.2 药物及试剂 GJ-4, 由暨南大学姚新生院士课题

组提供; 盐酸氟西汀(阳性对照药), 礼来苏州制药有限公司, 批号: 8373A; 利血平, 美国 Sigma 公司, 批号: WXBC4865V。药物配制: 氟西汀用 0.5% CMC-Na 配制成 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度; GJ-4 用 0.5% CMC-Na 分别配制成 2.5、5、10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度; 利血平用生理盐水配制成 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度, 现用现配。

异丙肾上腺素(批号: BCBF4079V)、EDTA-Na(批号: 2601C223)、去甲肾上腺素(NE, 批号: SLBP3018V)、多巴胺(DA, 批号: BCBC7614V)、高香草酸(HAV, 批号: 080M1406V)、二羟基苯乙酸(DOPAC, 批号: SLBP3018V)、5-羟色胺(5-HT, 批号: SLBP9361V)、二氢溴犬尿胺(批号: MKBZ2673V), 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 柠檬酸, 上海沪试化工有限公司, 批号: 20130328; 无水乙酸钠, 中国国药试剂公司, 批号: 10018818; 甲醇, 美国 Thermo Fisher 公司, 批号: 201209; 高氯酸, 天津鑫源化工有限公司, 批号: 51015; 磷酸氢二钾, 北京化学试剂公司, 批号: 050114; 盐酸司来吉兰, 芬兰 Orion 公司, 批号: H20040400; Triton X-100, 厦门 Sanland 化学试剂有限公司, 批号: K1265; 磷酸缓冲液, 北京索莱宝科技有限公司, 批号: 726P021; 柠檬酸钾(批号: 20120808)、NaOH(批号: 20190602), 均购自中国天津福晨化学试剂有限公司。

1.3 主要仪器 Waters e2695 型高效液相色谱仪、Waters2465 型电化学检测器, 美国 Waters 公司; KZ-II 型组织研磨仪, 武汉赛维尔生物有限公司; AR1140 型电子分析天平, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司; BCD-225u 型低温冰箱, 北京海信电器有限公司; 3-18K 型低温高速离心机, 美国 Sigma 公司; 超纯水系统, 美国 Millipore 公司; Fluoroskan 型微孔板荧光分光光度计, 美国 Thermo Fisher 科技公司。

1.4 分组、模型复制及给药 小鼠适应性饲养 2~3 d 后, 随机分为正常对照组、模型组(利血平组)、氟西汀组(阳性药组, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)及 GJ-4 低、中、高剂量组(25、50、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 17 只。各给药组小鼠按照上述剂量灌胃给药, 正常对照组及模型组给予等量 0.5% CMC-Na; 灌胃给药 30 min 后, 除正常对照组外, 其他各组小鼠均腹腔注射利血平($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 正常对照组给予等量生理盐水, 每日 1 次, 连续 14 d。

1.5 眼睑下垂程度观察 小鼠在末次给予利血平 1 h 后, 进行眼睑下垂程度观察。将小鼠放在桌面上, 观察动物是否出现眼睑下垂并进行眼睑下垂程度评分。评分标准: 0 分, 眼睑未关闭; 1 分, 眼睑关闭 1/4; 2 分, 眼睑关闭 1/2; 3 分, 眼睑关闭 3/4; 4 分, 眼睑完全关闭。观察时间为 15 s。

1.6 旷场实验 实验所用装置为 $50 \text{ cm} \times 50 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ 的正方体敞口箱, 底面用黑色油漆笔平均分成 25 个 $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ 的小方格。将小鼠按照同一方向放入正中间的格子, 观察小鼠首次走出格子的时间(潜伏期)以及 5 min 内所走过的格子数(均以后肢出格子为准)。每次实验结束后, 清洗方箱内壁及底面, 以免动物残留气味影响下次测试结果。

1.7 悬尾实验^[6-7] 在距小鼠尾巴尖 2 cm 处粘 1 条胶布, 把小鼠悬挂于距地面 30 cm 高处的架子上, 录像记录小鼠从挣扎到不动的时间, 观察时间上限为 6 min。

1.8 糖水偏好实验 第 1 天给予小鼠 2 瓶 1% 的蔗糖水, 第 2 天给予小鼠 1 瓶 1% 的蔗糖水和 1 瓶纯净水, 第 3 天禁食禁水, 第 4 天给予小鼠 1 瓶 1% 的蔗糖水和 1 瓶纯净水。每瓶水的体积均为 200 mL, 第 5 天测量第 4 天给予的糖水及纯净水的消耗量。计算: 糖水偏好系数(%) = 糖水消耗量/(糖水+纯净水消耗量)×100%。

1.9 荧光法测定小鼠脑皮层单胺氧化酶 A(MAO-A)的含量^[8] 行为学实验后, 拟通过测定小鼠脑皮层内单胺氧化酶-A(MAO-A)与底物二氢溴犬尿胺反应生成的 4-羟基喹啉的荧光值, 进而反映皮层内 MAO-A 的活性, 荧光值越高表明 MAO-A 的活性越高。分离小鼠脑皮层, 用 4 mL 磷酸缓冲液(pH 7.8、 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)匀浆后, 加入 0.4 mL Triton(20%)和 40 μL 司来吉兰; 混合物在 38 $^{\circ}\text{C}$ 条件下预孵 10 min, 然后加入 30 μL 二氢溴犬尿胺($2.19 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 使其最终浓度为 $22 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min 后, 加入 0.2 mL 高氯酸($5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)停止反应; 冷却后, 以 $1500 \times g$ 离心 10 min, 取 0.5 mL 上清液, 加入 2.5 mL NaOH($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。在激发波长 318 nm 和发射波长 380 nm 条件下, 测定反应产物中 4-羟基喹啉的荧光值; 根据荧光值与组织中总蛋白质含量(BCA 法测定蛋白质含量)的比值来反映组织中 MAO-A 的活性。

1.10 高效液相色谱-电化学检测法测定小鼠脑皮层内单胺类神经递质的含量^[9] 分离小鼠脑皮层, 每 1 mg

组织样品中加入 10 mL 含有异丙肾上腺素的 A 液 ($0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸溶液, 异丙肾上腺素终浓度为 $0.375 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 匀浆。以 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $20\,000 \times g$ 离心 20 min, 取上清。在上清中加入总体积一半的 B 液 (含柠檬酸钾 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、磷酸氢二钾 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、EDTA-Na $22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用), 冰浴条件下静置 30 min。以 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $20\,000 \times g$ 离心 20 min, 吸取上清。用 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 的滤膜过滤上清至进样瓶中。采用 Waters 高效液相联合电化学检测器检测单胺类递质的含量。流动相为乙酸钠-柠檬酸缓冲液 (先配制含有柠檬酸 $85 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、无水乙酸钠 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、EDTA-Na $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液 850 mL , 然后加入 150 mL 甲醇, 调节 pH 至 3.7)。色谱柱为 DIKMA C_{18} 柱, 泵流速: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测器检测灵敏度: 50 nA , 玻碳工作电极, Ag/AgCl 参比电极, 检测电位: 0.75 V , 柱温: $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量: $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。

1.11 统计学处理方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较用 LSD 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

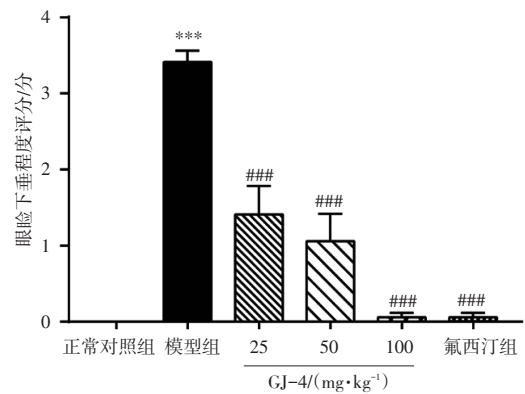
2 结果

2.1 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠眼睑下垂程度的影响 结果见图 1。与正常对照组比较, 模型组小鼠的眼睑下垂程度评分明显提高, 差异具有统计学意义($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组小鼠眼睑下垂程度评分明显降低, 且呈剂量依赖性, 差异具有统计学意义($P < 0.001$)。结果表明, GJ-4 可以改善抑郁症小鼠的眼睑下垂程度。

2.2 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠运动能力的影响

结果见图 2。与正常对照组比较, 模型组小鼠的运动功能明显受到抑制, 走出格子的潜伏期明显延长, 通过格子数明显减少, 差异均有统计学意义($P < 0.001$)。与模型组比较, GJ-4 中、高剂量组小鼠走出格子的潜伏期明显缩短, GJ-4 高剂量组小鼠通过的格子数明显增加, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.001$)。结果表明, GJ-4 可以改善抑郁症小鼠的运动能力。

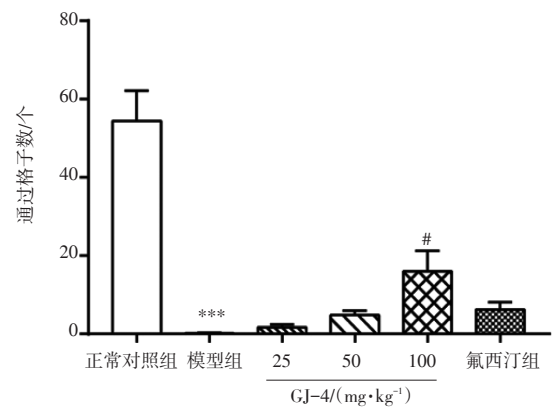
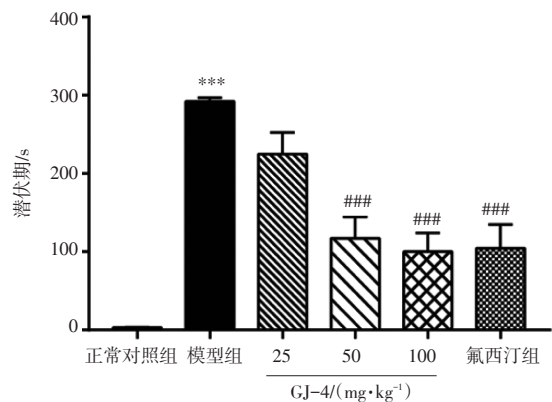
2.3 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠悬尾不动时间的影响 结果见图 3。与正常对照组比较, 模型组小鼠



注: 与正常对照组比较, *** $P < 0.001$; 与模型组比较, *** $P < 0.001$

图 1 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠眼睑下垂程度的影响($\bar{x} \pm s$, $n=17$)

Figure 1 Effect of GJ-4 on the blepharoptosis in depressed mice induced by reserpine($\bar{x} \pm s$, $n=17$)

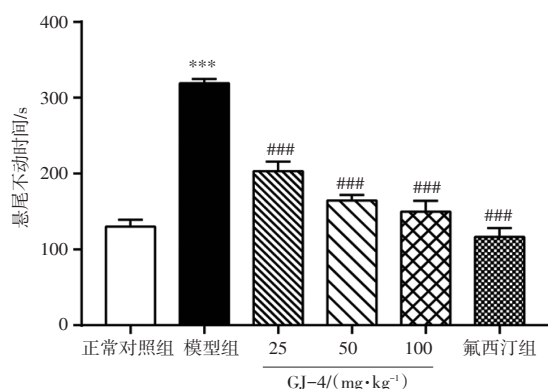


注: 与正常对照组比较, *** $P < 0.001$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

图 2 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠运动能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=17$)

Figure 2 Effect of GJ-4 on the motor abilities of depressed mice induced by reserpine in open field test($\bar{x} \pm s$, $n=17$)

悬尾 6 min 内的不动时间显著增加, 差异具有统计学意义($P < 0.001$), 提示抑郁症小鼠出现行为绝望。与模型组比较, 各给药组小鼠的悬尾不动时间明显缩



注：与正常对照组比较，*** $P < 0.001$ ；与模型组比较，### $P < 0.001$

图 3 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠悬尾不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=17$)

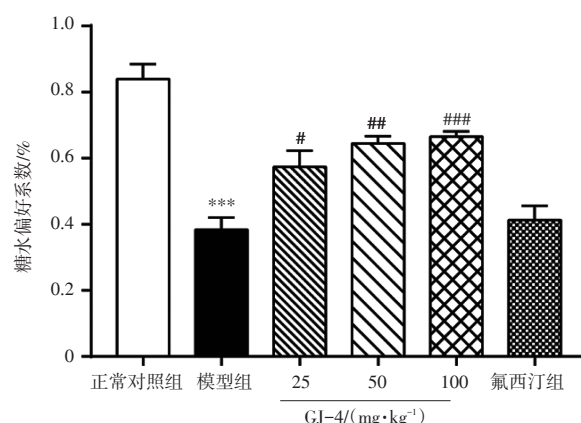
Figure 3 Effect of GJ-4 on tail suspension in depressed mice induced by reserpine ($\bar{x} \pm s$, $n=17$)

短，差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。结果表明，GJ-4 可明显减轻抑郁症小鼠的绝望程度。

2.4 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠糖水偏好的影响

结果见图 4。与正常对照组比较，模型组小鼠的糖水偏好系数明显降低，糖水的消耗量明显下降，差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)，提示抑郁症小鼠对糖水的反应性降低。与模型组比较，GJ-4 低、中、高剂量组小鼠的糖水偏好系数明显升高，糖水消耗量明显增加，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。结果表明，GJ-4 可提高抑郁症小鼠对糖水的偏好。

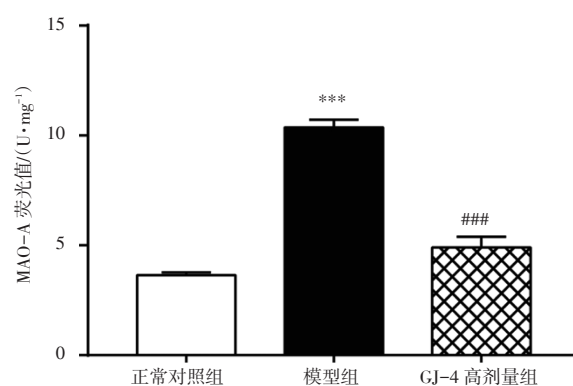
2.5 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠脑皮层内 MAO-A 的影响 结果见图 5。与正常对照组比较，模型组产生的 4-羟基喹啉荧光值显著升高，差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)，说明模型组小鼠脑皮层内 MAO-A 的含量明显上升。与模型组比较，GJ-4 高剂量组的 4-羟基喹啉荧光值显著降低，差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)，说明 GJ-4 高剂量组小鼠脑皮层内 MAO-A 的含量明显降低。结果表明，GJ-4 能够降低抑郁症小鼠脑皮层内的 MAO-A 水平。



注：与正常对照组比较，*** $P < 0.001$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 4 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠糖水偏好的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=17$)

Figure 4 Effect of GJ-4 on sugar water preference in depressed mice induced by reserpine ($\bar{x} \pm s$, $n=17$)



注：与正常对照组比较，*** $P < 0.001$ ；与模型组比较，### $P < 0.001$

图 5 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠脑皮层内单胺氧化酶 A (MAO-A) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 5 Effects of GJ-4 on the monoamine oxidase A (MAO-A) in the cortex of depressed mice induced by reserpine ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

2.6 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠脑皮层内单胺类神经递质含量的影响 结果见表 2。与正常对照组比较，模型组小鼠脑皮层内的 DA、DOPAC、5-HT、HAV 含量均明显下降，差异均有统计学意义 ($P <$

表 2 GJ-4 对利血平致抑郁症小鼠脑皮层内单胺类神经递质的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Table 2 Effect of GJ-4 on the content of monoamine transmitters in the cerebral cortex of depressed mice induced by reserpine ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	NE/(mg·g ⁻¹)	DA/(mg·g ⁻¹)	DOPAC/(mg·g ⁻¹)	5-HT/(mg·g ⁻¹)	HAV/(mg·g ⁻¹)
正常对照组	-	37.40 ± 12.38	322.84 ± 101.48	268.09 ± 46.74	41.65 ± 7.72	98.76 ± 25.06
模型组	-	27.50 ± 12.27	21.49 ± 3.60***	41.66 ± 13.47***	7.63 ± 5.25**	31.53 ± 8.06***
GJ-4 高剂量组	100	32.23 ± 9.26	55.63 ± 25.69	103.24 ± 19.96**	93.69 ± 16.24***	33.29 ± 5.84
氟西汀组	20	34.95 ± 11.98	80.97 ± 14.21	209.87 ± 36.87***	69.72 ± 27.26***	62.03 ± 11.77**

注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ；与模型组比较，** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

0.01, $P < 0.001$); 与模型组比较, GJ-4 高剂量组小鼠脑皮层内的 DOPAC、5-HT 含量明显升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。结果表明, GJ-4 可能通过影响 DOPAC、5-HT 的水平来改善抑郁症小鼠的症状。

3 讨论

GJ-4 是从中药栀子中提取的以藏红花色素为主要活性成分的复合物, 以藏红花苷-3 的含量最大, 且神经保护作用显著^[10]。本课题组前期研究^[4, 11]表明, GJ-4 对 $A\beta_{25-35}$ 侧脑室注射模型、冈田酸侧脑室注射模型、血管性痴呆模型及 L-东莨菪碱腹腔注射等学习记忆损伤模型小鼠, 均表现出较好的改善学习记忆的能力, 可能与其改善胆碱能系统功能紊乱及抑制脑内的神经炎症有关。GJ-4 可能通过抑制 JAK2/STAT1 相关炎症信号通路激活, 从而发挥抑制神经炎症的作用。

利血平是一种囊泡再摄取抑制剂, 可将递质留在囊泡外, 而易被单胺氧化酶 A(MAO-A)降解, 从而使儿茶酚胺类神经递质如去甲肾上腺素(NE)、二羟苯乙酸(DOPAC)及 5-羟色胺(5-HT)耗竭, 进而引起行为和生理上的变化。利用利血平建立的抑郁症动物模型具有造模时间短、动物痛苦小和操作简单的优点, 可以有效模拟临床患者单胺类递质水平低下的生理改变, 为快速筛选出抗抑郁药物及评价其药效提供了便利^[12]。因此, 本研究采用经典的利血平致抑郁症小鼠模型对 GJ-4 的抗抑郁作用进行评价。结果显示模型组小鼠出现了明显的眼睑下垂、运动不能、悬尾不动及糖水偏好反应性下降等症状, 表明实验造模成功。本研究结果表明, GJ-4 可以显著拮抗利血平所致的抑郁症模型小鼠眼睑下垂, 改善运动不能的情况, 降低悬尾不动的潜伏时间, 以及增加其对糖水的反应性, 以 GJ-4 高剂量组的效果最为明显, 且其对部分指标的改善作用优于阳性药氟西汀, 提示 GJ-4 具有一定的抗抑郁作用。

抑郁症的发病有多种假说, 其中单胺氧化酶(MAO)假说认为, MAO 含量增加时会导致多种神经递质含量下降最终导致抑郁症的发生。而 MAO 抑制剂的作用是使体内的单胺类物质明显增多, 使这些递质产生的效应明显增强。MAO 在体内分布广泛, 存在 2 种

亚型包括 MAO-A 与 MAO-B。MAO-A 可以催化与抑郁症相关的单胺类物质氧化脱氨, 抑制 MAO-A 的活性可以防止单胺类神经递质的破坏, 使得这些递质在突触间隙的作用增强^[13]。本研究结果表明, GJ-4 能够明显抑制利血平致抑郁症模型小鼠脑皮层内 MAO-A 活性的升高, 这可能是 GJ-4 改善利血平致抑郁症小鼠皮层单胺类递质减少的原因之一。

作为抑郁症的生理学基础, 5-HT 扮演着很重要的角色^[14], 抑郁症状的出现与 5-HT 含量的降低密不可分。5-HT 也称血清素, 在脑内情绪调节过程中起关键作用。目前临床上大多数抗抑郁药物也是通过调节中枢神经递质 5-HT 及 NE 或其受体, 从而缓解抑郁症状。有研究^[15]报道, 单胺类递质能通过调控神经营养因子来影响神经的发生及其可塑性, 也能影响下丘脑-垂体-肾上腺轴的免疫与抑制等。本研究结果表明, GJ-4 能够明显提高利血平致抑郁症模型小鼠皮层内 5-HT 的含量, 表明其抗抑郁作用可能与升高 5-HT 含量有关。

重摄取是多巴胺(DA)的主要灭活方式, DA 的最终灭活依赖于突触间隙酶的水解。动作电位促使囊泡中的 DA 释放到突触间隙, 与神经元的突触前膜结合发挥作用。被突触后膜的多巴胺转运体(DAT)重摄取并返回到神经元的 DA, 其中一部分被囊泡转运体(VAMT)转运进入囊泡内, 另一部分被 MAO-A 氧化脱氨成为 DOPAC。未被重摄取的 DA 则转化为高香草酸(HAV)。脑内的 DA 含量异常会导致抑郁症状, 产生包括悲伤、自我否定、缺乏激情等症状, DA 参与了动机和奖励相关行为, 并可改善精神运动迟缓的抑郁症状。本研究结果表明, 利血平致抑郁症小鼠的皮层海马区 DA、DOPAC、HAV 的含量都明显下降, 而 GJ-4 可显著提高 DOPAC 的含量, 提示 GJ-4 可能增加抑郁症小鼠皮层 DA 的合成, 并影响 DA 代谢朝 DOPAC 的方向进行。这可能与神经元内 MAO-A 的含量增加, 使得 DA 更多地被 MAO-A 水解有关^[16]。

综上所述, GJ-4 对利血平致抑郁症模型小鼠具有明显的抗抑郁活性, 其机制可能与抑制脑内 MAO-A 的活性, 增加脑内 5-HT 和 DOPAC 等神经递质的含量有关。

参考文献:

- [1] JOELLE L M, IAN H G. Depression: a cognitive perspective[J]. *Clinical Psychology Review*, 2019, 69: 51-66.
- [2] ZANG C X, BAO X Q, LI L, et al. The protective effects of gardenia jasminoides (fructus gardenia) on amyloid- β -induced mouse cognitive impairment and neurotoxicity[J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(2): 389-405.
- [3] ZHANG Z, LIU H, ZHAO Z, et al. GJ-4 alleviates A β (25-35)-induced memory dysfunction in mice through protecting the neurovascular unit[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: e110131.
- [4] 鞠程, 臧彩霞, 李方园, 等. 栀子提取物GJ-4改善L-东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(12): 1459-1463.
- [5] BYERS A, YAFFE K. Depression and risk of developing dementia [J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7: 323-331.
- [6] CASTAGNÉ V, MOSER P, ROUX S, et al. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice[J]. *Current Protocols in Pharmacology*, 2010, 49: 1934-1942.
- [7] 王吉菊, 刘建, 黄旭春, 等. 养阴舒肝颗粒对肝郁证模型小鼠行为学及脑内单胺类神经递质的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(1): 47-51.
- [8] CHAKRABARTI S K, LOUA K M, BAI C J. Modulation of monoamine oxidase activity in different brain regions and platelets following exposure of rats to methylmercury [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 1998, 20: 161-168.
- [9] QU Z W, LIU Y, ZHANG J T. Assay procedures for the determination of monoamines in the rat and mouse brain by means of reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 1987, 9(5): 371-375.
- [10] 张钰, 鲁丹, 倪阳, 等. 栀子活性部位GJ-4的HPLC指纹图谱及主成分含量测定研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2018, 34(4): 416-420.
- [11] 臧彩霞, 鲍秀琦, 张丹. 栀子藏红花色素部位GJ-4治疗阿尔茨海默症的药效学与作用机制研究[J]. *神经药理学报*, 2018, 8(3): 38.
- [12] HUMA I, DARAKHSHAN J H. Repeated treatment with reserpine as a progressive animal model of depression[J]. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 30: 897-902.
- [13] MEYER J H, GINOVAR T N, BOOVARIWALA A, et al. Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression[J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2006, 63(11): 1209-1225.
- [14] FAKHOURY M. Revisiting the serotonin hypothesis: implications for major depressive disorders[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(5): 2778-2786.
- [15] KRAUS C, CASTRÉN E, KASPER S, et al. Serotonin and neuroplasticity—links between molecular, functional and structural pathophysiology in depression[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 77: 317-326.
- [16] MALHI G S, BERK M. Does dopamine dysfunction drive depression? [J]. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 2007, 115: 116-124.

(编辑: 邹元平)