

培元解郁方对急性应激 BALB/c 小鼠的抗抑郁作用及 TRP-KYN 代谢途径的调节

张 静¹ 李海娜¹ 李丽娜² 范盎然² 于 雪² 刘保秀¹ 王萍萍¹ 畅洪昇¹

(1 北京中医药大学中药学院,北京,100102; 2 北京中医药大学基础医学院,北京,100029)

摘要 目的:研究培元解郁方的抗抑郁作用及其对色氨酸(Tryptophan, TRP)-犬尿氨酸(Kynurenine, KYN)途径的调节。方法:急性应激造成小鼠抑郁模型,采用 Noldus EthoVision XT9 系统采集分析小鼠强迫游泳不动时间,采用 HPLC-MS/MS 技术检测脑组织色氨酸、犬尿氨酸含量,实时荧光定量 PCR 检测肝组织中色氨酸 2,3-双加氧酶(Tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO)的 mRNA 表达水平。结果:急性应激可以引起小鼠不动时间延长,肝组织 TDO 活性增高, TDO mRNA 表达增多。天丝饮、培元解郁方能缩短小鼠不动时间($P < 0.05$),降低 TDO mRNA 表达数量,天丝饮尚有明显的抑制喹啉酸(Quinolinic acid, Q)作用。结论:天丝饮、培元解郁方具有抗抑郁药物样作用,这一作用可能与减少急性应激后血清皮质酮(Corticosterone, C)的含量,降低 TDO mRNA 的表达有关;天丝饮表现出明显的抑制神经毒性的作用可能与调节 KYN 代谢产物有关。

关键词 培元解郁方;抗抑郁;TRP-KYN 代谢途径

Anti-depressant Effect of Peiyuan Jieyu Decoction and Its Regulation on TRP-KYN Metabolic Pathway on Acute Stress BALB/c in Mice

Zhang Jing¹, Li Haina¹, Li Li'na², Fan Angran², Yu Xue², Liu Baoxiu¹, Wang Pingping¹, Chang Hongsheng¹

(1 School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2 School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To study the antidepressant effects of Peiyuan Jieyu Decoction and its regulation on the tryptophan-kynurenine (TRP-KYN) pathway. **Methods:** The mice model was established by acute stress. The immobility time in forced swimming test was acquired and analysed by Noldus EthoVision XT9 system. The content of tryptophan and kynurenine in brain tissue were detected by HPLC-MS/MS technique. The mRNA expression level of tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) in liver tissue was detected by real-time PCR. **Results:** Acute stress induced prolong of immobility time of Balb/c mice ($P < 0.05$). The TDO activity in liver tissue and the TDO mRNA expression level increased ($P < 0.01$). Tiansi Decoction and Peiyuan Jieyu Decoction could shorten the immobility time of mice ($P < 0.05$) and reduce the TDO mRNA expression. The inhibitory effect of Quinolinic acid by Tiansi Decoction was more significant. **Conclusion:** Tiansi Decoction and Peiyuan Jieyu Decoction has antidepressant effect. This effect may be related to the decrease of serum corticosterone levels after acute stress and the reduction of the TDO mRNA expression. Tiansi Decoction shows obvious inhibition to neurotoxins which may be related to the regulation of KYN metabolites.

Key Words Peiyuan Jieyu Decoction; Anti-depression; Tryptophan-Kynurenine (TRP-KYN) metabolic pathway

中图分类号:R259;R-332 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.03.038

四逆散出自《伤寒论》,是经典的疏肝解郁祖方^[1]。四逆散的抗抑郁作用可能与 5-HT 能神经元,促进神经营养、海马神经元发生等有关^[2],并有补肾元、定神志的功效。有研究表明,天丝饮中巴戟天有效成分是巴戟天寡糖,有较好的抗抑郁作用,具有与氟西汀相似的效应^[3-4]。本实验将四逆散、天丝饮进行合方,组成培元解郁方,采用急性应激 BALB/c 小鼠抑郁模型,对三方的抗抑郁作用进行了观察,并就

其对 TRY-KYN 代谢途径及其关键 TDO 含量的影响进行了研究,以明确 3 者的抗抑郁效应和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 BALB/C 小鼠 50 只,体质量 22~25 g,购自北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司,许可证编号:SCXK(京)2011-0004。

1.1.2 药物 丙咪嗪(批号:20140302A),由上海

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81373584)

作者简介:张静(1990.02—),女,在读研究生,研究方向:中药药效及作用机制研究, E-mail: yuan900214@126.com

通信作者:畅洪昇(1971.10—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:中药药效及作用机制研究, E-mail: chs1971@sina.com

信谊九福药业有限公司提供。培元解郁方由制巴戟天(批号:15001781)、炙甘草(批号:13002752)、北柴胡(批号:13002303)、盐菟丝子(批号:15004252)、白芍(批号:13002773)、麸炒枳实(批号:120601)组成。天丝饮配方颗粒由制巴戟天、盐菟丝子组成。四逆散配方颗粒由柴胡、白芍、炙甘草、枳实组成。上述药材颗粒均由北京康仁堂药业有限公司提供。

1.1.3 试剂与仪器 皮质酮(Corticosterone,货号C0388,TCI),DL-犬尿氨酸(货号61250,Sigma),犬尿喹啉酸(货号K3375,Sigma),喹啉酸(货号A11414,Alfa Aesar),色氨酸(货号T103480,Aladdin),5-HT(货号111656-200401,中检所),甲醇、己腈等均购自Fisher公司。TRIZOL REAGENT(货号15596026,invitrogen),SYBR Green PCR Mixture试剂盒(货号CW0957A),HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒(货号CW0744),均由Cwbio公司提供。

HPLC-MS/MS(美国戴安Ultimate3000-美国ABI公司3200 Q TRAP),Noldus EthoVision XT9(荷兰Noldus公司),荧光定量PCR仪(美国CFX96)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将小鼠分为5组,每组10只:模型组、天丝饮组、四逆散组、培元解郁组和丙咪嗪组。将小鼠置于高度25 cm,直径10 cm,水深10 cm的玻璃缸中,水温25℃,每缸一只,实验数据通过Noldus EthoVision XT9采集。

1.2.2 给药方法 急性模型于强迫游泳前4 h灌胃给药,随即进行强迫游泳试验。给药剂量参照前期实验^[5-6],天丝饮的给药量为1.5 g/kg,四逆散的给药量为0.8 g/kg,培元解郁给药量为2.3 g/kg,丙咪嗪给药量为50 mg/kg。急性应激小鼠于末次应激后进行行为学检测,并取材,进行相关指标测。

1.2.3 检测指标与方法 血清TRP、犬尿氨酸(Kynurenine, KYN)、犬尿烯酸(Kynurenic Acid, KA)、喹啉酸(Quinolinic acid, Q)、皮质酮(Corticosterone, C)含量的检测 摘眼球取血,静置于4℃冰箱,等待凝血后,置于离心机内,4℃、2 500 r/min离心15 min,取上清液100 μL置于-20℃冻存。用HPLC-MS/MS检测KYN、TRP、KA、Q、C含量,以血清TRP/KYN比值表示TDO活性,KYN/KA反映神经保护作用,KYN/Q比值反映神经毒性作用。

液相条件:色谱柱SLab HP-C₁₈(150×4.6 mm 5 μm),流动相A水相:水,B有机相:乙腈,进样量:20

μL,柱温30℃,流速0.8 mL/min。梯度洗脱:0~1 min,流动相B体积分数95%;1~8 min,流动相B体积分数95%~40%;8~8.1 min,流动相B体积分数40%~0%;8.1~10 min,流动相B体积分数0%;10~10.1 min,流动相B体积分数0%~95%;0.1~15 min,流动相B体积分数95%^[5]。质谱条件:扫描方式:MRM多反应监测;离子源:+ESI电喷雾离子源,正离子方式;TEM:500℃(雾化温度);EP:10(射入电压);IS:+5 500V(喷雾电压);CXP:2.0(碰撞室射出电压);GS1:55 psi(雾化气);CAD:Medium(碰撞气);GS2:60 psi(辅助气);CUR:20 psi(气帘气)。

肝TDO含量检测:将肝脏置于液氮内速冻,采用一步法抽提肝脏总RNA,取1 μL的RNA用1%的琼脂糖凝胶测电泳,最后用试剂盒进行反转录,此过程产品说明书进行,反转录后采用荧光定量PCR方法检测其含量,用SYBR PCR Mixture进行扩增。目的基因引物序列:TDO F为AAGGATTCAGGCTAAACCGACT, TDO R为TGCACGGTATGACAGTCGTC,扩增产物的大小为146 bp,最后用2-ΔΔct的方法对实验数据进行相对定量分析。

1.3 统计学方法 用统计软件SPSS 17.0,用单因素方差分析对多个样本均数进行比较,方差不齐时采用Dunnett's T3法,方差齐时用LSD法,以P<0.05为差异有统计学意义。实验数据均以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示。

2 结果

2.1 对强迫游泳不动时间的影响 在强迫游泳实验中,丙咪嗪、天丝饮、培元解郁方均能缩短小鼠急性应激不动时间,差异有统计学意义。见表1。

表1 对小鼠强迫游泳行为的影响($\bar{x} \pm s$,例数=10)			
组别 Group	剂量 (mg/kg)	例数 (n)	急性应激不动 时间(s)
模型组	-	10	117.81±44.70
丙咪嗪组	50	10	81.44±31.55*
四逆散组	800	10	97.48±41.18
天丝饮组	1 500	10	70.46±20.47**
培元解郁方组	2 300	10	73.96±32.98**

注:与模型组相比,*P<0.05,**P<0.01。

表2 对血清皮质酮含量的影响($\bar{x} \pm s$,例数=8)			
组别	剂量 (mg/kg)	例数 (n)	急性应激皮质酮 ng/mL
模型组	-	8	34.71±16.76
丙咪嗪组	50	8	18.60±10.08*
四逆散组	800	8	35.00±20.15
天丝饮组	1 500	8	16.44±12.19**
培元解郁方组	2 300	8	22.38±18.65*

注:与模型组相比,*P<0.05,**P<0.01。

表 3 对 TRP-KYN 代谢产物的影响($\bar{x} \pm s$,例数 = 8)

组别	剂量 (mg/kg)	例数 (n)	KYN/TRP	KYN/Q	KYN/KA
模型组	—	8	0.0146 ± 0.0019	11.81 ± 6.03	23.32 ± 7.76
丙咪嗪组	50	8	0.0172 ± 0.0065	15.37 ± 9.06	20.56 ± 3.93
四逆散组	800	8	0.0211 ± 0.0091	15.27 ± 3.56	17.98 ± 3.46
天丝饮组	1 500	8	0.0298 ± 0.0144	20.62 ± 2.35**	28.94 ± 7.24
培元解郁方组	2 300	8	0.0160 ± 0.0035	13.24 ± 5.74	18.41 ± 5.05

注:与模型组相比,** $P < 0.01$ 。

2.2 对 TRP-KYN 代谢产物及血清皮质酮含量的影响 丙咪嗪、天丝饮、培元解郁组均能减少急性应激后血清皮质酮的含量。治疗各组对 KYN/TRP、KYN/KA 比值无明显影响,天丝饮能提高 KYN/Q 比值,表现出抑制喹啉酸作用,与模型组比较, $P < 0.05$ 。见表 2、表 3。

2.3 对肝脏 TDOmRNA 表达的影响 天丝饮、培元解郁均能降低 TDOmRNA 的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 对 TDOmRNA 含量的影响($\bar{x} \pm s$,例数 = 8)

组别	剂量	例数	TDOmRNA 的表达
模型组	—	8	1.98 ± 0.75
丙咪嗪组	50	8	1.76 ± 0.65
四逆散组	800	8	1.64 ± 0.51
天丝饮组	1 500	8	1.12 ± 0.35*
培元解郁方组	2 300	8	1.25 ± 0.66*

注:与模型组相比,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

关于抗抑郁中药复方的研究已经有不少报道,大致包括:补益心脾、调和肝脾、化痰解郁、疏肝解郁、宁心安神、养阴降火、活血化瘀、补益肝肾等系列^[5]。其中,如复方还少丹、滋水清肝饮、归脾汤,单味中药如巴戟天、刺五加、何首乌、淫羊藿、甘草等,很多补虚方药具有确切的抗抑郁作用^[7-9]。中医郁证学说提出虚郁相关并重的治疗思想,并强调培元解郁的治疗方法^[10]。本实验基于上述基础,对培元解郁方的抗抑郁作用和特点进行了比较研究。

自从 20 世纪 70 年代,强迫游泳实验作为一种简便、快速、可信度高的动物模型,被广泛应用于抗抑郁药的评价和筛选以及抑郁症机制的研究中,小鼠被放置于一个相对局限的空间游泳,从不断挣扎想要逃脱到漂浮不动放弃逃脱(即“行为绝望”),在一定时间内经历了这种类似于人类抑郁症临床表现的外显行为。因此,本实验采用急性应激 Balb/c 小鼠抑郁模型,将 Balb/c 小鼠置于高度 25 cm,直径 10 cm,水深 10 cm 的玻璃缸中,观察小鼠 6 min 内游泳情况,记录下小鼠后 4 cm 内的累计不动时间,水

温 25 ℃ 时敏感性、可靠性最高^[11],可以作为评价抗抑郁药效的有效模型。本试验中,天丝饮与培元解郁方都能够缩短小鼠急性应激后累计不动时间,表现出较强的抗抑郁药物作用,效应与丙咪嗪相近。

抑郁症的病因机制非常复杂,它的发病涉及到体内多种系统的失衡,仅从一方面研究不能完整的阐明其发病机制^[12-13]。研究表明,TRP-KYN 代谢异常与抑郁症发病的可能关联如下:首先,犬尿氨酸的神经元活性代谢产物增多,造成了 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)过度激活与自由基的产生,引起神经元变性;其次,色氨酸耗竭,造成了 5-HT 能神经元功能的障碍。现已经证实,以上机制参与了抑郁症的发生,抗抑郁药物新的研究热点已经转向 TRP-KYN 代谢途径以及相关代谢酶和代谢产物^[14-15]。

色氨酸-犬尿氨酸代谢与应激时激素变化有密切的关系,糖皮质激素可以诱导 TDO 活性,从而改变 TRP-KYN 代谢。KYN 可代谢产生 KA,并进一步生成 Q,Q 是 NMDA 激动剂,与抑郁症的发生有直接的关系^[16-19]。研究表明,选择性 NMDA 受体拮抗剂,如 MK-801、GMP、CGP37849 等,能缩短悬尾试验和强迫游泳实验中小鼠的不动时间,产生抗抑郁作用。而 NMDA 受体激活可以产兴奋性氨基酸毒性作用,损害海马神经元并加重氧化应激反应,导致抑郁症的发生,其中 KYN/Q 的比值常用以间接评估其神经毒性作用^[20-23]。

本实验中,天丝饮、培元解郁方均能减少急性应激后血清皮质酮的含量,降低 TDO mRNA 的表达量。结合前期试验,抑制皮质酮引起的 TDO 表达增加和 5-HT 降低,可能是天丝饮、培元解郁方抗急性应激抑郁行为的机制。同时,天丝饮能够提高 KYN/Q 比值,表现出抑制 Q,抑制 NMDA 受体兴奋性毒性的作用,其抗抑郁样作用可能与此机制也有关。

总之,本实验表明,对于急性强迫游泳应激模型,天丝饮和培元解郁方均表现出一定的抗抑郁作用,机制与对抗糖皮质激素引起的 TDO 活性增高有

关,其中天丝饮在调节 KYN-Q 代谢方面有独特的作用,其机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 申子龙,庞博,宫晴,等.《伤寒论》四逆散证治及组方研究[J]. 中医杂志,2013,54(17):1524-1526.
- [2] 覃朗. 四逆散抗抑郁机制研究[J]. 当代医学,2010,16(14):29-30.
- [3] 邹连勇,张鸿燕. 巴戟天寡糖抗抑郁作用的研究进展[J]. 中国新药杂志,2012,21(16):1889-1891,1945.
- [4] 孔庆梅,舒良,张鸿燕,等. 巴戟天寡糖胶囊治疗抑郁症的临床疗效与安全性[J]. 中国临床药理学杂志,2011,27(3):170-173.
- [5] 周静洋,鲁艺,徐向青,等. 天丝饮的抗抑郁作用及其对 IDO 的调节[J]. 北京中医药大学学报,2015,38(3):182-185.
- [6] 周静洋,鲁艺,李海娜,等. 四逆散对 LPS 诱导抑郁小鼠模型的抗抑郁作用及 IDO 调节机制[J]. 中华中医药杂志,2015,30(12):4431-4433.
- [7] 王蕾,李丽. 中药复方治疗抑郁症实验研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(8):35-37.
- [8] 汤久慧,张丽萍,宋瑞雯. 中医药抗抑郁实验研究现状[J]. 河南中医,2014,34(7):1248-1251.
- [9] 周王谊,李欣欣. 抗抑郁单味中药研究进展[J]. 医学综述,2011,17(23):3624-3627.
- [10] 畅洪昇,段晓华,梁吉春,等. 中医郁证学说源流探析[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(10):653-661.
- [11] I Arai, Y Tsuyuki, H Shimoto, et al. Decreased body temperature dependent appearance of behavioral despair in the forced swimming test in mice. [J]. Pharmacological Research, 2000, 42(2):171-176.
- [12] 马宗国,江南,余梦瑶,等. 抑郁症发病机制及中药治疗研究进展[J]. 中国实验动物学报,2011,19(6):548-552.
- [13] 黄洁云. 抑郁症的发病机制与治疗进展[J]. 中国疗养医学,

2013,22(3):233-235.

- [14] Oxenkrug GF. Tryptophan kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environmental impacts in major depressive disorder; the serotonin hypothesis revisited 40 years later[J]. The Israel Journal Of Psychiatry And Related Sciences, 2010, 4(1):56-63.
- [15] DM Christmas, JP Potokar, SJ Davies. A biological pathway linking inflammation and depression; activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. [J]. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2011, 7(7):431-439.
- [16] 刘宇凝,蒋春雷,王云霞. 炎症诱发抑郁症:吲哚胺 2,3 双加氧酶的激活是关键环节之一[J]. 现代生物医学进展,2012,12(14):2751-2756,2762.
- [17] 管西婷,林文娟. 抑郁症发病机理中的重要调节因子:吲哚胺 2,3-双加氧酶[J]. 心理科学进展,2013,21(6):951-957.
- [18] 王丽莎,刘新民,冯利,等. 犬尿氨酸通路在神经退行性疾病中的研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(11):69-75.
- [19] 王道涵,王素梅,卫利,等. 犬尿酸代谢途径异常与中枢神经系统疾病[J]. 生理科学进展,2016,47(1):43-46.
- [20] Guillemin GJ, Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin[J]. FEBS J, 2012, 279(8):1356-1365.
- [21] 陈慧彬,李菲,吴帅,等. 应激性抑郁样行为发生中海马喹啉酸对谷氨酸及其受体的调节[J]. 生理学报,2013,65(6):577-585.
- [22] Skolnick P, Popik P, Trullas R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on[J]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30(11):563-569.
- [23] SM Gibney, EM Fagan, Ann-Marie Waldrona, et al. Inhibition of stress-induced hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase exhibits antidepressant activity in an animal model of depressive behaviour[J]. The International Journal of Neuropsychopharmacology, 2014, 17(6):917-928.

(2016-02-23 收稿 责任编辑:白桦)

(上接第 626 页)

- [11] 黄艳菲,孙美,许云章,等. 2 不同炮制方法对加拿大产西洋参中 10 种人参皂苷的影响[J]. 中国中药杂志,2014,39(20):3950-3954.
- [12] Mathur A, Gangwar A, Mathur AK, et al. Growth kinetics and ginsenosides production in transformed hairy roots of American ginseng-*Panax quinquefolium* L[J]. Biotechnol Lett, 2010, 32(3):457-461.
- [13] Kashem SW, Riedl MS, Yao C, et al. Nociceptive Sensory Fibers Drive Interleukin-23 Production from CD301b + Dermal Dendritic Cells and Drive Protective Cutaneous Immunity [J]. Immunity, 2015, 43(3):515-526.
- [14] 宋媛媛,周越,孙守兵,等. 丁香苷对免疫功能低下小鼠的免疫调节作用[J]. 中药药理与临床,2013,29(2):44-47.
- [15] Roscoe C, Gilles R, Reed AJ, et al. Poliovirus immunity in newly re-

settled adult refugees in Idaho, United States of America. Vaccine [J]. 2015, 33(26):2968-2970.

- [16] 孙燕,王冬梅. 小牛脾提取物注射液对免疫功能低下小鼠的免疫调节作用[J]. 中国生化药物杂志,2014,2(34):58-60.
- [17] Rey-Jurado E, Riedel CA, González PA, et al. Contribution of autophagy to antiviral immunity [J]. FEBS Lett, 2015, 589(22):3461-3470.
- [18] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:759-760.
- [19] Surace L, Lysenko V, Fontana AO, et al. Complement is a central mediator of radiotherapy-induced tumor-specific immunity and clinical response[J]. Immunity, 2015, 42(4):767-777.

(2016-04-27 收稿 责任编辑:白桦)