

加味龙牡宁神汤对抑郁症小鼠模型的影响

侯深东，王晓波，顾丽霞，张健，王静，曲有乐*
(浙江海洋学院 食品与医药学院，浙江 舟山 316000)

[摘要] 目的:以抑郁症小鼠为模型,观察加味龙牡宁神汤对抑郁症小鼠的影响。方法:取 ICR 小鼠 60 只,随机分为 5 组,分别为正常组、氟西汀组(25 mg·kg⁻¹)、加味龙牡宁神汤 4,8,16 g·kg⁻¹组,每组均按 0.02 mL·g⁻¹体重给小鼠 ig,其中正常组灌服等量生理盐水,每日 1 次,连续给药 10 d,通过检测小鼠体重、行为变化,观察加味龙牡宁神汤对小鼠急性应激的影响;另取小鼠 72 只,随机分为 6 组,分别为正常组、利血平模型组、氟西汀组(25 mg·kg⁻¹)、加味龙牡宁神汤 4,8,16 g·kg⁻¹组,其中正常组、利血平模型组 ig 等量生理盐水,每日 ig 给药 1 次,连续给药 10 d,观察小鼠眼睑不能、出圈个数、体温,采集小鼠血清和全脑测定白细胞介素-2(IL-2)、5-羟色胺(5-HT)含量,观察加味龙牡宁神汤对抑郁症小鼠的影响。结果:加味龙牡宁神汤对急性应激反应的结果显示,与正常组比较,加味龙牡宁神汤能明显缩短小鼠游泳和悬尾累积不动时间($P<0.05$, $P<0.01$);加味龙牡宁神汤对抑郁症小鼠的结果显示,与模型组比较,加味龙牡宁神汤能明显降低血清中 IL-2 水平,明显拮抗利血平导致的小鼠体温下降、眼睑下垂及活动不能状态和利血平引起的 5-HT 含量下降($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:加味龙牡宁神汤有一定的抗抑郁作用,其作用机制可能与增加 5-HT 含量和降低 IL-2 水平有关。

[关键词] 加味龙牡宁神汤; 抑郁症; 小鼠模型

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)11-0107-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110107

Effects of Modified Longmu Ningshen Decoction on Mouse Model of Depression HOU Shen-dong, WANG Xiao-bo, GU Li-xia, ZHANG Jian, WANG Jing, QU You-le* (School of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Modified Longmu Ningshen decoction (MLND) on the mouse model of depression. **Method:** Sixty ICR mice were randomly divided into 5 groups: the normal group (normal saline), the fluoxetine group (25 mg·kg⁻¹) and the low-, medium-, high-dose MLND groups (4, 8, 16 g·kg⁻¹). The corresponding medicines and normal saline at 0.02 mL·kg⁻¹ body weight were administrated to the mice once daily for 10 days. The effect on acute stress including tail suspension immobility time and swimming immobility time, the changes of body weight, body temperature and behavior were observed. Another 72 ICR mice were randomly divided into 6 groups: the normal group (normal saline), the model group (reserpine), the fluoxetine group (25 mg·kg⁻¹) and the low-, medium-, high-dose MLND groups (4, 8, 16 g·kg⁻¹). The corresponding medicines at 0.02 mL·kg⁻¹ body weight were administrated to the mice once daily for 10 days. The effect on depression including ptosis, akinesia and temperature were observed. The contents of interleukin-2 (IL-2) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in serum and the whole brain were determined. **Result:** Compared with the normal group, MLND could shorten the immobility time of tail suspension and swimming of mice in the acute stress experiment ($P<0.05$, $P<0.01$). MLND could reduce the levels of IL-2, inhibit the reserpine-induced body temperature rising, eye ptosis and akinesia of mice, and decrease the level of 5-HT significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** MLND has a certain anti-depression effect and the mechanism may be related to increasing 5-HT and decreasing of IL-2.

[Key words] Modified Longmu Ningshen decoction; depression; mouse model

[收稿日期] 20140903(020)
[基金项目] 国家星火计划项目(2012GA700194);浙江省科技厅项目(2010R50029-19)
[第一作者] 侯深东,在读硕士,从事海洋药物开发与利用研究,Tel:18368097276,E-mail:houshendong@126.com
[通讯作者] *曲有乐,教授,研究生导师,从事海洋药物开发与利用研究,Tel:13957233208,E-mail:YouLe1960@163.com

抑郁症 (depression) 是一种以情绪低落为主要表现的情感障碍性疾病,约 15% 的患者有自杀倾向,不仅给患者带来巨大精神痛苦,对社会稳定与经济发展造成很大影响^[1-2]。龙牡宁神汤有重镇养心,安神之功效,主治精神抑郁,表情淡漠,或躁动不安,喃喃自语,喜怒无常等;相关研究^[3]证明龙牡颗粒能够降低血清中细胞因子水平和抗心率失常作用,本文通过加味栀子、淡豆豉的龙牡宁神汤,探讨其对抑郁症小鼠模型行为学及体内单胺类神经递质和细胞因子的影响^[4-5]。

1 材料

1.1 动物 ICR 小鼠,清洁级,132 只,雄性,18 ~ 22 g,购于浙江省医学科学院,合格证号 SCXK(浙)2014-0001,室温 25 ~ 28 ℃ 饲养,小鼠维持粮由天津天垚生物科技有限公司提供。

1.2 药物及试剂 加味龙牡宁神汤组成:生龙骨 30 g,生牡蛎 30 g,浮小麦 30 g,炙甘草 10 g,大枣 15 g,枳实 12 g,竹茹 5 g,栀子 15 g,淡豆豉 10 g(以上各中药均购于同仁堂药店,由浙江海洋学院食品与医药学院曲有乐教授鉴定为正品),盐酸氟西汀(中华试剂网试剂,批号 20130601),0.9% 的生理盐水(浙江国镜药业有限公司,批号 B14031106),利血平(上海晶纯生化科技股份有限公司,批号 32709)。小鼠 5-羟色胺(5-HT)试剂盒(美国 BD 公司,批号 201407),小鼠白细胞介素-2(IL-2)试剂盒(美国 BD 公司,批号 201407)。

1.3 仪器 DFY-400 型中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司),TD5K 型低速离心机(长沙东旺实验仪器有限公司),JT002NM 型数字体温计(MEDEXPPO 公司),SM800 型酶标仪(上海永创医疗器械有限公司)。

2 方法

2.1 加味龙牡宁神汤的制备 按中药组方准确称取经粉碎的各味药材,浸于 12 倍的水中,浸泡 30 min,煎煮 45 min,在 3 500 r·min⁻¹ 条件下离心 12 min,煎煮 2 次,取上清液混合,在悬转蒸发仪上除去部分水,分别浓缩为含生药 0.2,0.4,0.8 g·mL⁻¹ 组,4 ℃ 低温保存备用。

2.2 急性应激小鼠模型的建立与给药 取实验小鼠 60 只,随机分为 5 组,分别为正常组,25 mg·kg⁻¹ 氟西汀组,加味龙牡宁神汤 4,8,16 g·kg⁻¹ 组,其中正常组 ig 等量生理盐水,每组均按 0.02 mL·g⁻¹ 体积 ig,每日 1 次,连续给药 10 d,进行各指标测定^[6]。

2.2.1 对小鼠体重的影响 在实验过程中,第 1,9

天相同时间段测定小鼠体重,并进行组间比较^[7]。
2.2.2 小鼠悬尾实验 于实验第 9 天,给药 1 h 后,将小鼠尾部用医用胶布粘贴悬挂在铁架台横梁上,悬挂时间 6 min,观察后 4 min 内小鼠累积不动时间,并做组间比较^[8-9]。

2.2.3 强迫游泳实验 连续给药 10 d 后,将小鼠依次放在盛有 25 ℃ 温水的 1 000 mL 烧杯中,使小鼠后爪刚可能触及水底,但又不能支撑体重,强迫游泳 6 min,观察后 4 min 内小鼠累积不动的时间^[10]。

2.2.4 对小鼠血清中白细胞介素-2(IL-2)水平的影响 将上述给药 10 d 后的小鼠,进行摘眼球取血于 1.5 mL 离心管,2 000 r·min⁻¹ 离心取上清液,-80 ℃ 保存,采用 ELISA 方法检测,按试剂盒说明书操作,检测血清中 IL-2 含量^[11]。

2.3 利血平化小鼠模型的建立与给药 取实验小鼠 72 只,随机分为 6 组,分别为正常组,利血平模型组,25 mg·kg⁻¹ 氟西汀组,加味龙牡宁神汤 4,8,16 g·kg⁻¹ 组,其中正常组、利血平模型组 ig 等量生理盐水,每组均按 0.02 mL·g⁻¹ 体重给小鼠 ig,每日 1 次,连续给药 10 d,在最后给药 1 h 后,正常组注射生理盐水,其他各组注射 0.50 g·L⁻¹ 利血平注射液 0.2 mL,进行各指标测定。

2.3.1 对利血平小鼠模型眼睑不能、出圈个数的影响 在第 10 天,给药 2 h 后观察各组小鼠眼睑不能的个数、直径 7.5 cm 白纸 15 s 出圈个数并做组间比较^[12]。

2.3.2 对利血平小鼠模型体温的影响 在实验最后给药 2 h 后,测量小鼠肛温并做组间比较。

2.3.3 对利血平小鼠模型单胺类神经递质 5-HT 的影响 将上述给药 10 d 后的小鼠脱颈椎处死,取小鼠的全脑,加入 2 mL 的 PBS(pH 7.4),在组织匀浆机中匀浆处理,将组织匀浆装入离心管中,于 4 ℃ 条件下以 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清液于 1.5 mL 离心管中,-80 ℃ 保存,采用 ELISA 方法检测,按试剂盒说明书操作,检测全脑中 5-HT 含量。

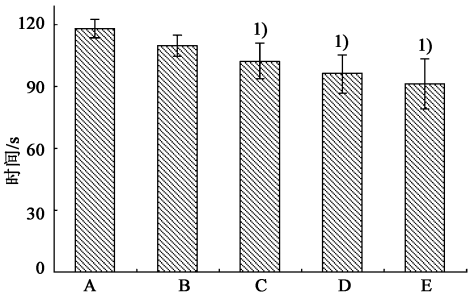
2.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析,用 LSD 法对数据进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠体重的影响 第 1 天分组时,体重没有明显差异,第 8 天时与正常组比较,氟西汀组和龙牡宁神汤各剂量组对小鼠体重增长均有一定抑制作用,其中氟西汀组致使小鼠体重增长减缓程度较大,

龙牡宁神汤各剂量组对小鼠体重增长抑制作用较弱,但各组经统计学分析差异并不显著,表明该汤剂不会对小鼠正常代谢、体重增长产生明显影响。

3.2 对小鼠悬尾累积不动时间的影响 与正常组比较,加味龙牡宁神汤 8,16 g·kg⁻¹组均可明显缩短小鼠悬尾实验累积不动时间($P < 0.05$),且悬尾不动时间与各剂量组呈现良好的剂量关系;氟西汀组也可以明显缩短小鼠悬尾实验累积不动时间($P < 0.05$)。见图 1。



A. 正常组;B. 加味龙牡宁神汤 4 g·kg⁻¹组;C. 加味龙牡宁神汤 8 g·kg⁻¹组;D. 加味龙牡宁神汤 16 g·kg⁻¹组;E. 氟西汀 0.025 g·kg⁻¹组;与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (图 2 同)

图 1 加味龙牡宁神汤对小鼠悬尾实验累积不动时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 1 Effects of modified Longmu Ningshen Tang on tail suspension immobility time of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

3.3 对小鼠游泳累积不动时间的影响 与正常组比较,加味龙牡宁神汤各剂量组均能明显缩短小鼠游泳累积不动时间($P < 0.01$),氟西汀组也能明显缩短小鼠游泳累积不动时间($P < 0.01$),其中加味龙牡宁神汤 8,16 g·kg⁻¹组游泳累积不动时间减少较为明显,较强于氟西汀组和加味龙牡宁神汤 4 g·kg⁻¹组。见图 2。

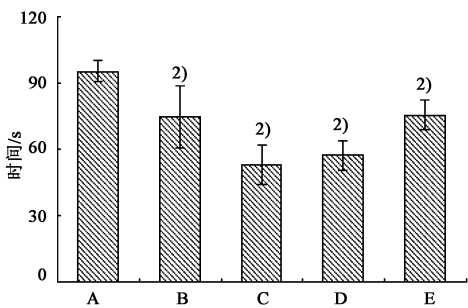


图 2 加味龙牡宁神汤对小鼠游泳累积不动时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 2 Effects of modified Longmu Ningshen Tang on swimming immobility time of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

3.4 对利血平模型鼠眼睑不能、出圈个数的影响 与利血平组比较,加味龙牡宁神汤各剂量组均能减

少小鼠眼睑不能的个数,其中加味龙牡宁神汤 16 g·kg⁻¹组差异较明显($P < 0.05$),氟西汀组也能明显减少小鼠眼睑不能的个数($P < 0.05$);与利血平组比较,加味龙牡宁神汤 16 g·kg⁻¹组和氟西汀组小鼠出圈率明显增加($P < 0.05$)。见表 1。

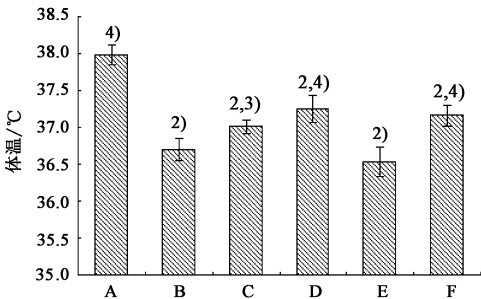
表 1 加味龙牡宁神汤对小鼠眼睑不能、出圈个数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 1 Effects of modified Longmu Ningshen Tang on ptosis and akinesia in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	眼睑不能 /个(%)	出圈 /个(%)
正常	-	0(0)	12(100 ⁴⁾)
加味龙牡宁神汤	4	7(58.33)	5(41.67 ²⁾)
	8	5(41.67)	5(41.67 ²⁾)
	16	4(33.33 ³⁾)	9(75 ³⁾)
模型	-	10(83.33)	3(25 ²⁾)
氟西汀	0.025	4(33.33 ³⁾)	9(75 ³⁾)

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3,图 3 同)。

3.5 对模型小鼠体温的影响 与正常组比较,模型组小鼠体温明显降低($P < 0.01$),有统计学意义,表示造模成功;与模型组比较,加味龙牡宁神汤 16 g·kg⁻¹组和氟西汀组能明显拮抗利血平造成的小鼠体温下降($P < 0.01$),加味龙牡宁神汤 8 g·kg⁻¹组也能明显拮抗利血平造成的小鼠体温下降($P < 0.05$);但加味龙牡宁神汤各剂量组和氟西汀组并不能恢复到正常水平。见图 3。



A. 正常组;B. 加味龙牡宁神汤 4 g·kg⁻¹组;C. 加味龙牡宁神汤 8 g·kg⁻¹组;D. 加味龙牡宁神汤 16 g·kg⁻¹组;E. 模型组;F. 氟西汀 0.025 g·kg⁻¹组

图 3 加味龙牡宁神汤对小鼠体温的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 3 Effects of modified Longmu Ningshen Tang on of temperature in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

3.6 对小鼠血清中 IL-2 和全脑中 5-HT 含量的影响 与正常组比较,氟西汀组能明显降低小鼠血清中细胞因子 IL-2 水平($P < 0.01$),加味龙牡宁神汤

各剂量组也能明显降低小鼠血清中 IL-2 水平 ($P < 0.01$);对于小鼠全脑单胺类神经递质 5-HT 的影响,与正常组比较,模型组小鼠全脑 5-HT 含量明显降低,差异极显著 ($P < 0.01$),表示造模成功,与模型组比较,加味龙牡宁神汤 $8,16\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组能明显拮抗利血平引起的 5-HT 含量降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 加味龙牡宁神汤对小鼠体内 IL-2 和 5-HT 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effects of modified Longmu Ningshen Tang on IL-2 and 5-HT content in mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-2/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	5-HT/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
正常	—	734.29 $\pm$ 19.87	160.09 $\pm$ 6.66
加味龙牡宁神汤	4	685.52 $\pm$ 21.44 ²⁾	130.43 $\pm$ 6.41 ²⁾
	8	623.69 $\pm$ 22.51 ²⁾	139.25 $\pm$ 5.25 ^{2,3)}
	16	561.86 $\pm$ 16.64 ²⁾	149.26 $\pm$ 6.68 ^{1,3)}
模型	0.005	—	132.06 $\pm$ 5.08 ²⁾
氟西汀	0.025	612.70 $\pm$ 27.61 ²⁾	138.98 $\pm$ 4.81 ²⁾

4 讨论

龙牡宁神汤方中生龙骨为君药以平肝潜阳,以生牡蛎为臣药与龙骨相须为用,以加强滋阴潜阳重镇的作用,佐以甘麦大枣汤益心气,养心药,安神之效;栀子、淡豆豉联用具有倾泻胸膈郁热的功效,又可治疗阴阳郁热等症,诸药配伍,共奏重镇安神,益气养心之功;本研究结果显示,在急性应激小鼠模型中,加味龙牡宁神汤能明显缩短小鼠悬尾实验累积不动时间和小鼠游泳实验累积不动时间,和阳性药物氟西汀作用相似;在利血平化小鼠模型中,加味龙牡宁神汤 $16\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组能够明显减少小鼠睁眼不能的个数,增加小鼠出圈率,拮抗利血平导致的小鼠体温下降,以上表明加味龙牡宁神汤具有一定的抗抑郁作用。相关研究表明^[13-14],抑郁症患者血清 IL-2 等细胞因子水平明显升高,利血平的使用,可以降低小鼠单胺类神经递质特别是 5-HT,且 IL-2 和 5-HT 在抑郁症方面研究较多,本研究通过测定小鼠体内 IL-2 和单胺类神经递质 5-HT 含量,表明其抗抑郁作用机制可能与增加单胺类神经递质 5-HT 和降低致炎性细胞因子 IL-2 水平有关,本研究将近一步根据抑郁症发病机制,对加味龙牡宁神汤作用机制进行深入研究,同时本研究仍存在不足之处,在利血平小鼠模型中测定 5-HT 含量时,阳性药物氟西汀组和利血平组实验结果显著性没有统计学意义,可能与

利血平、氟西汀用药剂量不足有关,本课题组将在今后工作中进行改进。

[参考文献]

[1] 王江淮. 柴胡龙骨牡蛎汤治疗肝郁型抑郁症的理论与临床研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2011.

[2] 池名,青雪梅,潘彦舒,等. 120 例抑郁症患者大脑多神经递质变化初探[J]. 中国中药杂志,2014,39(8): 1516-1524.

[3] 许洪霞,史默怡,王婷婷,等. 羚桂龙牡颗粒对病毒性心肌炎小鼠血清 IFN- γ , IL-4 水平的影响[J]. 中国中医药科技,2011, 18(4):298-299.

[4] 李培英. 中医名方新用[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2008;246.

[5] Pandey D K, Mahesh R, Kumar A A, et al. A novel 5-HT 2A receptor antagonist exhibits antidepressant-like effects in a battery of rodent behavioral assays: approaching early-onset antidepressants [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2010, 94(3):363-373.

[6] 赵丽辉,张一折,韩德明,等. 缬草醇提物和水提物萃取组分对小鼠的抗抑郁作用[J]. 郑州大学学报:医学版,2012,47(1):47-49.

[7] 朴美香. 红景天提取物对小鼠慢性应激抑郁模型的影响[J]. 中国民康医学, 2009, 21(23):2997-2998.

[8] 高新雅,漆仲云,高瑞丽,等. 自拟柴青解郁汤对抑郁症小鼠的抗抑郁作用[J]. 新乡医学院学报,2014, 31(3):170-173.

[9] 杨春蕊. 小鼠抑郁症模型建立及干预,行为学和海马 GFAP 变化研究[D]. 昆明:昆明医科大学, 2013.

[10] 康大力,瞿融,朱维莉,等. 柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁有效部位的筛选[J]. 中药药理与临床,2009, 25(2):3-5.

[11] 王艳梅. 香草醛吸嗅改善 C57 小鼠抑郁样行为及其机制的探索[D]. 合肥:安徽医科大学, 2013.

[12] 王秀海. 栀子豉汤口服液制备工艺及药效学研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2011.

[13] Dekeyne A, Mannoury la Cour C, Gobert A, et al. S32006, a novel 5-HT_{2C} receptor antagonist displaying broadbased antidepressant and anxiolytic properties in rodent models [J]. Psychopharmacology (Berl), 2008, 199(4):549-568.

[14] Goodwin G M, Emsley R, Rembry S, et al. Agomelatine prevents relapse in patients with major depressive disorder without evidence of a discontinuation syndrome: a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. J Clin Psychiatry, 2009, 70(8):1128-1137.

[责任编辑 周冰冰]