

炒焦枣提取物的抗抑郁作用及其机制

邵利伟¹, 黄锋¹, 詹合琴^{1*}, 杨帆², 孙娟³

(1. 新乡医学院药学院, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院基础医学院, 河南 新乡 453003; 3. 新乡医学院护理学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 目的 探讨炒焦枣提取物对抑郁症的作用及其对脑和脾组织中白蛋白 D-位点结合蛋白 (DBP)、 γ -氨基丁酸 B2 受体 (GABBR2) 和 P 物质 (SP) 蛋白表达的影响。方法 用皮质酮连续腹腔注射 21 d 复制小鼠抑郁模型, 旷场法测定各组小鼠的行为学指标; 高效液相荧光法 (HPLC-荧光法) 测定各组小鼠脑组织中谷氨酸 (Glu), γ -氨基丁酸 (GABA) 的含有量; Western Blot 技术测定小鼠脑组织与脾脏组织中 DBP、GABBR2 和 SP 蛋白的表达。结果 模型组小鼠的平行移动格数和直立次数明显减少, 且伴随着脑组织中 Glu 水平的增高和 GABA 水平的降低, 与对照组比较有显著性的差异, 提示模型建立成功。给予炒焦枣提取物后可明显增加抑郁小鼠的平行移动格数和直立次数, 与模型组比较有显著性差异; 炒焦枣提取物使抑郁小鼠脑组织中的 GABA 水平明显上升, Glu 水平明显降低, 与模型组相比有显著性差异; 炒焦枣提取物高剂量组均增加了抑郁小鼠脑组织和脾脏组织中 DBP、GABBR2 及 SP 蛋白的表达。炒焦枣提取物的高剂量组在小鼠的行为学指标和 DBP 及 SP 蛋白表达的方面作用优于阳性对照药。结论 炒焦枣提取物可有效改善抑郁症状, 其机制可能与调控脑组织和脾脏组织中 DBP、GABBR2 与 SP 蛋白的表达有关。

关键词: 炒焦枣提取物; 抑郁症; DBP; GABBR2; SP; 脑组织; 脾脏组织

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2016)04-0912-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.04.043

抑郁症是一种常见的心境障碍, 其发病率, 致死率和致残率高, 易反复发作, 对人类健康产生了严重的不良影响^[1]。中医中药具有注重整体、副作用小、多层次、多靶点、多途径治疗的优势和特色^[2]。因此, 研究和开发治疗抑郁症的中药制剂并探明其作用机制, 有着重要的现实意义和远景。

大枣 (*Ziziphus sativa* Gaertn) 为鼠李科枣属, 在我国临床应用已有 1 000 多年的历史。明代李时珍在《本草纲目》记载“大枣味甘无毒, 主心腹邪气, 安中养脾气, 平胃气, 通九窍, 助十二经, 补少气, 少津液, 身中不足, 大惊, 四肢重, 和百药, 久服轻身延年”。大枣有益心脾, 和中缓急之功效^[3], 但在一般中药配方中, 大枣往往居臣位, 加枣以提高药效, 为百药之引^[4], 对于大枣的单独药理药效作用少有研究。而在中医治疗抑郁症的经典药方中, 往往多有加入大枣^[5-8], 大枣中富含低聚糖, 低聚糖可有效改善机体免疫功能^[9]。更为可喜的是环磷酸腺苷 (cAMP) 是枣果中最为突出的重要生物活性物质, 含有量在高等植物中最高^[8]。抑郁症发病机制中第二信使失衡假说认为抑郁症患者脑中 cAMP 下调, 而抗抑郁药可上调 cAMP 的表

达^[9]。石森林等曾将经典药方甘麦大枣汤中的 3 味药分开来分析他们的提取液对抑郁症的治疗作用, 结果发现均有抗抑郁作用^[10], 但他们并没有对大枣进行炮制, 且其抗抑郁的机制亦未做深入研究。故此, 本实验拟通过行为学、高效液相和 Western blot 技术探讨炒焦枣提取物对抑郁症的作用及其对脑和脾组织中 DBP、GABBR2 与 SP 蛋白表达的影响。

1 材料和仪器

1.1 实验动物 BALB/c 小鼠 (清洁级), 18~22 g, 均为雌性动物。购于河南省华兰生物工程技术有限公司实验动物中心 (合格证号 SCXK Henan 2010-0001)。

1.2 药品试剂 大枣为黄河滩枣 (市售); 皮质酮 (美国 Sigma-Alorich, 批号 BCK7907V, 纯度 $\geq 98.5\%$) 购于郑州博兴生物科技有限公司; 谷氨酸 (批号 514A024) 购自 Solarbio 公司; γ -氨基丁酸 (YY10158) 与 L-高丝氨酸 (YY10469) 购自上海源叶生物科技有限公司; SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (批号 00111408)、高灵敏度化学发光检测试剂盒 (批号 00091408)、Super-Bradford 蛋白定量试剂盒 (批号 00031408)、SDS-PAGE 上样缓冲液 (还原, 5 \times , 批号 00071407) 和蛋白酶抑制剂混合物 (PMSF, 批号

收稿日期: 2015-05-25

基金项目: 新乡市重点科技攻关计划项目 (ZG14006)

作者简介: 邵利伟 (1986—), 女, 硕士, 研究方向为神经精神药理。

* 通信作者: 詹合琴 (1967—), 女, 副教授, 研究方向为神经精神药理。

网络出版日期: 2015-08-20

23141) 均购自康为世纪生物科技有限公司; RIPA 裂解液 (强, 批号 P0013B) 购自碧云天生物技术研究所; Red blood cell lysing buffer (红细胞裂解液, 批号 RNBC5060) 与 Hanks' Balanced Salts (Hanks' 液, 批号 H1387) 购自美国 Sigma 公司; 抗 β -Actin 单克隆抗体 (批号 01141) 购自康为世纪生物科技有限公司; Anti-D Box Binding Protein antibody (批号 GR109342-4) 与 Anti-GABAB Receptor 2 antibody (批号 GR149960-1) 购自英国 Abcam 公司; Tachykinin (FL-129) rabbit polyclonal (批号 L2627) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology。

1.3 主要实验仪器 502B 型旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司); SHZ-DIII 循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限公司); NF6002 水浴锅 (上海申生科技有限公司); 郑州英诺生物 C_{18} 柱 (郑州英诺生物科技有限公司); Chromatography Systems Walnut Creek (美国 Varian 公司); 高速冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher 公司); 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices); Mini-PROTEAN Tetra system (美国 Bio-Rad 公司); GelDoc-Ht2 Imagers (美国 UVP 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、抑郁模型建立和给药 小鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组、炒焦枣提取物低剂量组 (0.5 g/kg) 和炒焦枣提取物高剂量组 (1 g/kg)。正常对照组为 10 只动物, 其它每组 15 只动物。小鼠抑郁模型按照陈姣等人的方法^[11]用 20 mg/kg 皮质酮混悬液腹腔注射进行复制。正常对照组给予等体积的生理盐水, 所有动物连续给药 21 d。在实验过程中, 正常对照组动物无死亡, 抑郁模型动物的成功率约为 75% ~ 85%, 模型组和阳性对照组实验入组动物各为 10 只; 炒焦枣提取物低剂量组和高剂量组实验入组动物各为 9 只。模型造成后, 炒焦枣提取物低剂量组和高剂量组动物给予相应剂量的药物, 正常对照组和模型组给予生理盐水, 阳性对照组给予氟西汀 30 mg/kg, 均按 5 mL/kg 的容量灌胃给药, 每天上午 8 ~ 10 点之间给药。所有入组动物均参与行为学试验, 其中每组 6 只动物用于 HPLC-荧光检测, 6 只动物用于 Western blot 检测。

2.2 炒焦枣提取物的制备 取 2 kg 大枣, 在干锅中炒焦, 然后进行切片。将所有炒焦大枣的切片放于 80% 的无水乙醇和 20% 的水混合液中冷浸 10 d (1 : 8), 在浸泡过程中, 每天搅动 1 次。将药物浸提液用旋转蒸发器蒸馏提取获得药物的浓缩液并收存。回收蒸出的乙醇加适量的单蒸水混匀后, 再次浸泡炒焦大枣的切片 7 d, 然后再进行提取 1 次。最终, 将所有的浓缩液放入平底容器中用干燥箱 55 °C 进行干燥制膏。将制备的膏状物装瓶, 放入 -4 °C 冰箱中待用。

2.3 旷场实验 将小鼠单独放在无盖敞箱内 (55 cm × 55 cm × 40 cm), 于箱子的底部用白线分成 11 cm × 11 cm 大小的方格, 箱底和四壁制成黑色。用佳能 XF300 摄影机摄像记录小鼠的自发活动。分别在造模的第 21 天和给药后 7 d 测定小鼠的移动距离和直立次数。先把小鼠放在箱子的

底部中间, 让其自由活动适应环境 3 min 后, 再进行测量 5 min。两次实验之间, 箱子底部需用 70% 的乙醇擦洗干净。每次测量时, 室内温度保持在 27 °C 并使室内安静。小鼠每通过一个小格或跨越 10 cm 分别被记做 1 分^[12], 同时小鼠的双前肢直立或接触纸箱壁被记录为直立 1 次。

2.4 HPLC-荧光法 本实验参照张丽等人对大鼠脑内氨基酸类神经递质的测定方法进行适当优化进行此次测定^[13]。

2.4.1 色谱条件流动相 A 液, 0.1 mol/L $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (pH 6.78); B 液, 甲醇: 乙腈 (3 : 1)。A 液与 B 液按照 64 : 36 比例混合。用 0.22 μm 微孔滤膜过滤并脱气 20 min。 $\lambda_{ex} = 355$ nm, $\lambda_{em} = 450$ nm。体积流量 1.0 mL/min; 柱温 38 °C; 进样量 20 μL 。

2.4.2 标准品配制 用 50% 甲醇溶液配制标准品贮备液, 谷氨酸、 γ -氨基丁酸及高丝氨酸浓度均为 2 mmol/L, 用 0.04 mol/L 高氯酸稀释为 6.25 ~ 400 $\mu mol/L$ 的标准品, 含内标 100 $\mu mol/L$ 。

2.4.3 测试样品 制备动物处死后, 冰浴下取出脑组织 (去除小脑), 精确称重后以 1 : 10 (质量: 体积) 加入生理盐水, 用匀浆器匀浆, 提取液在 4 °C, 3 000 r/min 条件下, 低温离心 15 min, 取上清液 300 μL , 加 0.04 mol/L 高氯酸 (含内标液 100 $\mu mol/L$) 600 μL 混匀, 14 000 r/min 4 °C 低温离心 30 min, 取上清。

2.4.4 样品中氨基酸含量的测定 取 40 μL 样品或标准品溶液, 加 20 μL 邻苯二甲醛衍生试剂, 在恒温振荡器上混匀 30 s, 冰浴准确反应 2 min, 取 20 μL 进样, 记录样品峰面积和内标峰面积的比值, 带入标准曲线得各氨基酸的含有量。

2.5 Western Blot 技术

2.5.1 脑和脾脏组织蛋白的提取 小鼠脱臼处死, 冰上剖出脑组织和脾脏组织, 剪碎, 脑组织加入 RIPA 裂解液与 PMSF 混合液, 冰上裂解 30 min, 在 4 °C, 13 000 r/min 下离心 15 min 后取上清。脾脏组织用胶原酶 I 消化脾脏 1 h, 离心去除上清。加入红细胞裂解液, 轻轻吹打后, 冰上裂解 1 ~ 2 min。而后再离心 7 min, 去上清。收集沉淀, 加 1 mL Hanks' 液, 在 4 °C, 500 $\times g$ 条件下离心。最后加入 RIPA 裂解液和 PMSF 混合液, 冰上裂解 30 min。最后在 4 °C, 13 000 r/min 下离心 15 min, 取上清。

2.5.2 蛋白定量 按照 Super-Bradford 蛋白定量试剂盒测定组织蛋白的量。加 SDS-PAGE 上样缓冲液, 在沸水中煮 10 min, 放入 -80 °C 冰箱中待用。

2.5.3 Western Blot 分析根据分子量大小配制相应浓度的分离胶 (DBP 12%, GABBR2 8%, SP 12%) 和 5% 的浓缩胶, 加样并开始 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 转膜, 恒流 200 mA, 转膜时间依据分子大小而定 (DBP 45 min, GABBR2 120 min, SP 30 min, β -Actin 45 min); 将膜放入 5% 的牛奶中封闭 1 h; 孵育一抗 (DBP 1 : 1 000; GABBR2 1 : 500; SP 1 : 200; β -Actin 1 : 2 000), 4 °C 冰箱过夜; 用 TBST 洗膜后放入二抗中孵育 1 h, DBP、GABBR2 与 SP 二

抗均为 1 : 2 000 , TBST 洗膜 , ECL 显影照相。用 Image-J 图像分析软件进行各条带的灰度值测定 , 以目的条带和内参条带的比值作为半定量的依据。每组实验重复 3 次。

2.6 统计学方法 实验所得数据以均数 $\bar{x} \pm s$ 表示 , 采用 SPSS 19.0 统计软件包 , 各组间比较采用单因素方差分析 , 凡 $P < 0.05$ 者具有统计学意义。

3 结果

3.1 炒焦枣提取物对小鼠旷场实验中行为学评分的影响

实验结果发现 , 与正常对照组比较 , 模型组小鼠的平行格数和直立次数显著降低 ($P < 0.01$) ; 炒焦枣提取物组与模型组比较 , 能明显地增加抑郁小鼠的平行移动格数和直立次数 ($P < 0.01$) ; 其低剂量组的作用与阳性对照组比较 , 无显著性差异 ($P > 0.05$) , 而其高剂量组强于阳性对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 1。

表 1 炒焦枣提取物对小鼠抑郁行为学评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

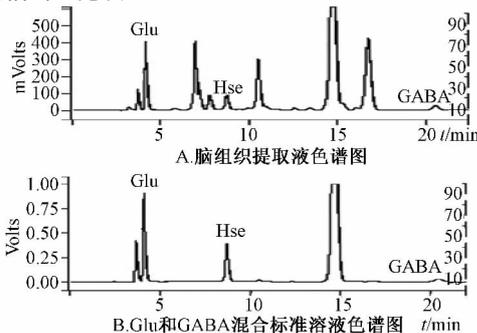
组别	剂量/ ($g \cdot kg^{-1}$)	平行格数/格	直立次数/次
正常对照组	-	34.22 ± 1.99	3.33 ± 1.00
模型组	-	10.11 ± 1.62**	1.00 ± 0.87**
阳性对照组	0.03	33.78 ± 2.54 $\Delta\Delta$	2.44 ± 1.01 $\Delta\Delta$
炒焦枣提取物低剂量组	0.5	32.11 ± 1.36 $\Delta\Delta$	2.56 ± 0.73 $\Delta\Delta$
炒焦枣提取物高剂量组	1	37.33 ± 1.66 $\Delta\Delta\#\#$	3.33 ± 0.71 $\Delta\Delta\#$

注 : 与正常对照组比较 , ** $P < 0.01$; 与模型组比较 , $\Delta\Delta P < 0.01$; 与阳性对照组比较 , # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

0.01 ; 与阳性对照组比较 , # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.2 炒焦枣提取物对抑郁小鼠脑组织内氨基酸类神经递质水平的影响

在本实验中 , Glu 和 GABA 在 23 min 内得以很好地达到基线分离 , 其保留时间分别为 : Glu 4.06 min , GABA 20.39 min。见图 1。研究结果发现 , 模型组的 Glu 含量比正常对照组明显升高 , 有显著性差异 ($P < 0.05$) ; 炒焦枣提取物高剂量组的 Glu 含量明显降低 , 与模型组比较 , 具有显著性差异 ($P < 0.05$) ; 与阳性对照组比较 , 炒焦枣提取物的低、高剂量组均未有统计学差异 ($P > 0.05$)。另外 , 模型组小鼠脑组织中 GABA 的含有量显著降低 , 与正常对照组相比 , 有显著性差异 ($P < 0.01$) ; 炒焦枣提取物高剂量组可显著提高 GABA 的含有量 , 与模型组比较 , 有显著性统计学差异 ($P < 0.01$) , 且其作用与阳性对照组相当。见表 2。



注 : 保留时间分别为 Glu 4.06 min , GABA 20.39 min

图 1 脑组织样品 Glu 与 GABA 标准色谱图

表 2 炒焦枣提取物对抑郁小鼠脑组织中 Glu 和 GABA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/ ($g \cdot kg^{-1}$)	Glu/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	GABA/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)
正常对照组	-	5.79 ± 0.57	11.54 ± 1.28
模型组	-	7.52 ± 1.28*	6.10 ± 1.00**
阳性对照组	0.03	5.95 ± 0.91 Δ	8.71 ± 0.80 $\Delta\Delta$
炒焦枣提取物低剂量组	0.5	6.25 ± 0.45	7.11 ± 0.32
炒焦枣提取物高剂量组	1	5.81 ± 0.70 Δ	9.85 ± 0.36 $\Delta\Delta$

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

3.3 炒焦枣提取物对抑郁小鼠脑组织内 DBP、GABBR2 及 SP 蛋白表达的影响

实验结果发现 , 模型组中的 DBP、GABBR2 与 SP 蛋白表达与正常对照组相比 , 有显著性统计学差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) , 且均为下降趋势 ; 用药后 , 炒焦枣提取物低、高剂量组均可增加 DBP 蛋白的含有量 , 与模型组比较 , 有显著性差异 ($P < 0.01$) , 作用强于阳性对照组 ($P < 0.01$)。在 GABBR2 蛋白表达方面 , 只有炒焦枣提取物高剂量组增加了 GABBR2 的表达 , 与模型组比较 , 有显著性差异 ($P < 0.01$) , 作用与阳性对照药相当。在 SP 蛋白表达方面 , 炒焦枣提取物的低、高剂量组与模型组比较 , 均增加了 SP 蛋白的表达 , 有显著性的差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) , 且高剂量组作用强于阳性对照组 ($P < 0.01$)。见图 2 和表 3。



图 2 炒焦枣提取物对抑郁小鼠脑组织内 DBP、GABBR2 及 SP 蛋白表达的影响

3.4 炒焦枣提取物对抑郁小鼠脾脏组织 DBP、GABBR2 及 SP 水平的影响

在脾脏组织中 , 结果发现 GABBR2 蛋白在脾脏中不表达 , 而 DBP 与 SP 蛋白有表达。模型组动物脑组织中 DBP 与 SP 蛋白的表达均降低 , 与正常对照组比较 , 有显著性差异 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) ; 用药后 , 炒焦枣提取物低剂量组与模型组比较 , 无显著性差异 ($P > 0.05$) , 其高剂量组的 DBP 与 SP 含有量相对于模型组有上升趋势 , 且有显著性统计学差异 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与阳性对照药比较 , 炒焦枣提取物低、高剂量组升高 DBP 的作用更强 ; 在 SP 蛋白表达方面 , 无显著性差异 ; 由于 GABBR2 在脾脏中不表达 , 因此未能统计其蛋白含有量。见图 3 和表 4。

表3 炒焦枣提取物对抑郁小鼠脑组织内 DBP、GABBR2 及 SP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / ($g \cdot kg^{-1}$)	DBP	GABBR2	SP
正常对照组	-	1.08 ± 0.08	0.73 ± 0.11	0.66 ± 0.05
模型组	-	0.43 ± 0.04 ^{**}	0.46 ± 0.07 ^{**}	0.48 ± 0.04 [*]
阳性对照组	0.03	0.25 ± 0.05	0.81 ± 0.05 ^{△△}	0.70 ± 0.10 ^{△△}
炒焦枣提取物低剂量组	0.5	1.03 ± 0.14 ^{△△##}	0.55 ± 0.05	0.62 ± 0.04 [△]
炒焦枣提取物高剂量组	1	2.36 ± 0.37 ^{△△##}	0.71 ± 0.05 ^{△△}	0.95 ± 0.11 ^{△△##}

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与阳性对照组比较, ## $P < 0.01$

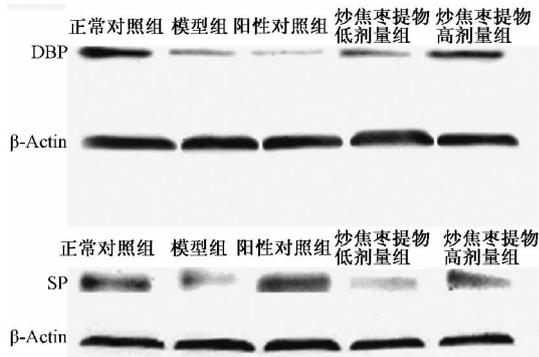


图3 炒焦枣提取物对抑郁小鼠脾脏组织 DBP 与 SP 蛋白表达的影响

表4 炒焦枣提取物对抑郁小鼠脾脏组织 DBP、GABBR2 及 SP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / ($g \cdot kg^{-1}$)	DBP	GABBR2	SP
正常对照组	-	0.41 ± 0.08	-	0.52 ± 0.05
模型组	-	0.15 ± 0.01 ^{**}	-	0.37 ± 0.07 [*]
阳性对照组	0.03	0.01 ± 0.00	-	0.62 ± 0.11 ^{△△}
炒焦枣提取物低剂量组	0.5	0.11 ± 0.02 [#]	-	0.40 ± 0.05
炒焦枣提取物高剂量组	1	0.28 ± 0.04 ^{△△##}	-	0.54 ± 0.09 [△]

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与阳性对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

4 讨论

抑郁症的发病机理尚不清楚, 已有的假说如单胺类递质理论, 神经生化机制, 脑内神经肽及受体改变等^[14], 虽然从不同的角度揭示了抑郁症可能的发病机制, 并在动物实验和临床研究中得到病理学方面的支持, 但各种假说都不能解释所有抑郁症的发病原因, 基于以上假说所使用的临床药物也作用有限^[15]。对于抑郁症, 我国传统医学中虽无抑郁症病名, 但对其认识有着悠久的历史^[16], 且认为抑郁症的病因病机有脾失健运, 肝失疏泄, 肾阳不足等^[17]。治疗药方主要有健脾益气方, 疏肝解郁方, 养心安神方, 豁痰理气方等^[18]。很多学者认为脾在志为思, 脾藏意, 人的思维、意识等活动均与脾密切相关, 脾失健运在抑郁症发病中占有重要地位^[19-20]。

枣中的低聚糖具有提高小鼠免疫功能, 且其含有的丰富的环磷酸腺苷正是抑郁小鼠中所缺乏的^[21]。大枣外果皮是由结构致密的表皮细胞构成, 外被角质层, 在制剂时其主要成分难易透过外果皮。在用炒焦方法炮制以后, 其外

果皮破裂会变得比较疏松, 有利于大枣的有效成分最大限度地进入浸提液, 从而提高了药物利用率, 降低不必要的损耗^[22]。将大枣炒焦并剖开入药可使有效含量提高, 且符合“焦香健脾”的中医理论^[23]。在叶定江等人编著的《中药炮制学辞典》中记载: 炒焦大枣可增强其补益作用, 且炒焦可减少药物的刺激性^[24], 故本实验采用炒焦枣提取物进行抗抑郁及其作用机制的研究。

本实验中, 采用腹腔注射皮质酮法诱导小鼠抑郁。结果发现模型组抑郁小鼠的平行移动格数、直立次数均减少, 且其脑组织中的 GABA 含量明显减少, Glu 含量明显增加, 此结果提示本实验所采用的动物模型是成功和可靠的。Glu 是脑内兴奋性氨基酸, 它的高表达会引起兴奋性神经毒性, 而 GABA 属于抑制性氨基酸, 当人体内缺乏时会产生焦虑、不安、疲倦、忧虑等情绪, 因此, Glu 的高表达或者 GABA 的低表达均会产生抑郁样症状^[25-26]。在脑组织中, 本研究发现炒焦枣提取物高剂量组可明显降低抑郁小鼠的 Glu 含量, 同时升高 GABA 含量, 与氟西汀组效果相当。

在发现了炒焦枣提取物有良好的抗抑郁作用后, 我们进一步探讨了其抗抑郁作用的机制。结果发现炒焦枣提取物的高剂量组分别增加了脑组织和脾脏组织中 DBP 与 SP 蛋白的表达量。DBP, 是一个钟控因子, 已经有研究表明它与精神疾病有着不可或缺的关系^[27], 它的缺失可导致小鼠出现抑郁样症状, 且在第十二届世界精神病遗传大会上 Niculescu 建议以 DBP 缺失小鼠作为抑郁症模型更为方便^[28], 后来又通过进一步研究证实在抑郁样小鼠中 DBP 含量呈现下降趋势, 注射甲基苯丙胺后 DBP 含量上升, 小鼠呈兴奋状态^[29]。这些结果说明炒焦枣提取物的抗抑郁作用可能与其增加脑组织和脾脏组织中 DBP 的含有量有关。

SP 是一种由前速激肽原 1 (tachykinin 1, TAC1) 编码的脑肠肽, 在神经系统及外周组织中表达丰富。众多研究者也对其与抑郁症的关系做了研究, 旨在探索新的靶点^[30]。有学者研究发现在抑郁症患者和小鼠的脑脊液与血液中 SP 是上升的^[31-32], 但在脑组织中的结果却存在争议, 有研究表明模型组中的 SP 表达升高^[33], 也有研究的结果正好相反^[34], 此种分歧可能与研究者模型的选择, 研究部位的选择以及研究动物的选择等有关。本实验的结果发现抑郁模型组动物脑组织中 SP 是下降的, 且炒焦枣提取物可明显提高 SP 的表达量。

GABBR2 是 GABA 受体的亚基, 在脑组织中表达丰富,

在脾脏组织中没有蛋白表达^[35]。但是,它与抑郁症的关系非常密切,且在抑郁样小鼠脑组织中呈下降趋势^[36],Fate-mi S H等人研究同样发现 GABBR2 蛋白表达的降低与抑郁样行为的发生紧密联系^[37]。本实验中 GABBR2 蛋白表达的结果与他人的研究基本一致,炒焦枣提取物可通过上调 GABBR2 蛋白的表达缓解抑郁症状。

抑郁症的主要靶器官是脑,但在中国的传统医学中,“脾”也被众多医家认为与抑郁有关^[38],现代意义上的脾是中医“脾”的一部分。故本实验主要研究了炒焦枣提取物对脑和脾脏组织中 DBP、SP 以及 GABBR2 蛋白表达的影响。本研究发现,模型组动物脑组织中 DBP、SP 蛋白的表达趋势与脾脏组织是一致的,且炒焦枣提取物高剂量组均提高了两种蛋白的表达。钟控基因可调控生命节律,生命节律的异常可导致多种精神疾病^[39]。SP 作为一种神经调质,与机体免疫,炎症、疼痛和抑郁有着密切关系^[40]。由此可见,炒焦枣提取物改善抑郁症的机制可能主要与上调在脑与脾脏组织中的 DBP 和 SP 蛋白含量有关。至于炒焦枣提取物中何种单体成分可作为未来的潜在抗抑郁药物,则需要进一步的研究。

参考文献:

[1] 龚梦鹃,何伟,唐春萍,等. 桂枝解郁胶囊抗抑郁作用的药理实验研究[J]. 中成药,2011,33(7): 1121-1125.

[2] 刘佳莉,苑玉和,陈乃宏. 抑郁症的治疗研究进展[J]. 中国药理学通报,2011,27(9): 1193-1196.

[3] 杨静. 甘麦大枣汤临床应用与药理研究近况[J]. 国医论坛,2003,18(5): 53-55.

[4] 刘世珍. 天然维生素E丸一枣[J]. 中国食物与营养,2004(7): 56-58.

[5] 张保国,许卫锋. 小柴胡汤现代临床加减应用[J]. 中成药,2010,32(9): 1581-1583.

[6] 康健,李作平. 抗抑郁天然药物的研究概况[J]. 中成药,2006,28(5): 713-716.

[7] 赵文,王向红,赵仁邦,等. 金丝小枣低聚糖对昆明种小鼠免疫功能的影响[C] //达能营养中心第九次学术年会论文集. 厦门: 达能营养中心,2006: 182-185.

[8] Wang C, Liu Y, Wang H, et al. Nanofiltration extraction and purification method for cyclic adenosine monophosphate (cAMP) from Chinese date fruit[M]. Advances in Applied Biotechnology. Germany: Springer, 2015: 521-531.

[9] 文睿婷,张汉霆,冯婉玉,等. 磷酸二酯酶-4的中枢功能研究进展[J]. 中国药理学通报,2014,30(4): 452-456.

[10] 石森林,何三民,葛卫红,等. 甘麦大枣汤提取方法与提取工艺的研究[C] //第七届全国中药和天然药物学术研讨会论文集. 济南: 中国药学会,2003: 74-76.

[11] 陈姣,楚世峰,李婧,等. FK506 binding protein 51参与糖皮质激素介导的抑郁样行为的发生[J]. 中国药理学通报,2014,30(3): 407-412.

[12] 程世翔,涂悦,张赛,等. 11 β -羟类固醇脱氢酶-1在慢性温和应激抑郁大鼠海马组织中的表达[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2012,21(7): 634-637.

[13] 张丽,叶翠飞,沈芊,等. 高效液相荧光法测定大鼠脑内氨基酸类神经递质方法的改良[J]. 中国实验动物学报,2011,19(5): 377-380.

[14] Patel A. Review: the role of inflammation in depression[J]. *Psychiatr Danub*, 2013, 25(Suppl 2): S216-S223.

[15] 张兵,李扬. 针对谷氨酸能系统的抗抑郁药物的研究进展[J]. 中国药理学通报,2014,30(9): 1197-1200.

[16] 修丽娟,杨玉兴,俞珊,等. 抑郁症中医研究回顾与展望[J]. 中西医结合学报,2008,6(4): 416-421.

[17] 张有为,谢忠礼. 抑郁症中医病因病机探讨[J]. 中医学报,2010,25(3): 435-436.

[18] 何媛媛,徐自升,姚仲青,等. 抗抑郁方药研究进展[J]. 南京中医药大学学报,2011,27(5): 495-497.

[19] 陈林庆,张震文,彭晓明,等. 脾失健运与抑郁症发病机制探讨[J]. 世界中西医结合杂志,2011,6(10): 907-908.

[20] 马妮,陈林庆,刘立,等. 从脾论抑郁症与情志及心理应激的相关性[J]. 世界中西医结合杂志,2010,5(1): 79-80.

[21] 田俊生,高杉,崔元璐,等. 小鼠灌胃大枣提取物后血清和海马组织中 cyclic AMP 的含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7): 102-104.

[22] 王克周. 大枣炮制方法探讨[J]. 内蒙古中医药,2006,25(2): 24-24.

[23] 陈振武,张钦德,王兴顺. 炮制对大枣煎出物含量的影响[J]. 现代中药研究与实践,2003,17(3): 23-24.

[24] 叶定江,原斯通. 中药炮制学辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社,2005: 321.

[25] Hashimoto K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder[J]. *Brain Res Rev*, 2009, 61(2): 105-123.

[26] Esra K, Melek Z S, Mecit Ç, et al. The change in plasma GABA, glutamine and glutamate levels in fluoxetine-or S-citalopram-treated female patients with major depression[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009, 65(6): 571-577.

[27] Niculescu A B, Segal D S, Kuczenski R, et al. Identifying a series of candidate genes for mania and psychosis: a convergent functional genomics approach[J]. *Physiol Genomics*, 2000, 4(1): 83-91.

[28] Niculescu A B, Rich M, Nicastro I, et al. Behavioral studies in mice lacking the clock gene DBP: a possible animal model of anhedonia [C] //Abstracts for the XIIIth world congress of psychiatric genetics, Burlington Hotel, Dublin, Ireland, 9th-13th October 2004: 26.

[29] Le-Niculescu H, McFarland M J, Ogden C A, et al. Phenomic, convergent functional genomic, and biomarker studies in a stress-reactive genetic animal model of bipolar disorder and co-morbid alcoholism[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2008, 147(2): 134-166.

[30] Mclean S. Do substance P and the NK1 receptor have a role in depression and anxiety? [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(12): 1529-1547.

- [31] Geraciotti T D Jr, Carpenter L L, Owens M J, *et al.* Elevated cerebrospinal fluid substance p concentrations in posttraumatic stress disorder and major depression [J]. *Am J Psychiatry* 2006, 163(4): 637-643.
- [32] 侯彩兰, 贾福军, 陈佐明, 等. 重性抑郁症患者脑脊液中P物质、神经肽Y、5-羟色胺及去甲肾上腺素含量的研究[J]. *中华精神科杂志*, 2005, 38(4): 198-201.
- [33] 张丽萍, 吴沛然, 汤久慧, 等. 加味温胆汤及其拆方对抑郁模型大鼠行为学及下丘脑神经肽的影响 [C] //第四届 中国中西医结合学会心身医学专业委员会换届大会暨第七届全国中西医结合心身医学学术交流会议论文集. 西安: 中国中西医结合学会, 2013: 306-313.
- [34] Brodin E, Ögren S, Theodorsson-Norheim E. Effects of sub-chronic treatment with imipramine, zimelidine and alaproclate on regional tissue levels of substance P-and neurokinin A/neurokinin B-like immunoreactivity in the brain and spinal cord of the rat [J]. *Neuropharmacology*, 1987, 26(6): 581-590.
- [35] Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, *et al.* Molecular structure and physiological functions of GABAB receptors [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(3): 835-867.
- [36] Fatemi S, Folsom T, Rooney R, *et al.* Expression of GABAA $\alpha 2-$, $\beta 1$ -and ϵ -receptors are altered significantly in the lateral cerebellum of subjects with schizophrenia, major depression and bipolar disorder [J]. *Transl Psychiatry*, 2013, 3(9): e303.
- [37] Fatemi S H, Reutiman T J, Folsom T D, *et al.* Downregulation of GABAA receptor protein subunits $\alpha 6$, $\beta 2$, δ , ϵ , $\gamma 2$, θ , and $\rho 2$ in superior frontal cortex of subjects with autism [J]. *J Autism Dev Disord*, 2014, 44(8): 1833-1845.
- [38] 彭计红, 梅晓云. 抑郁症与脾脏之关系考释 [J]. *中医药学刊*, 2003, 21(11): 1833-1840.
- [39] Li J Z, Bunney B G, Meng F, *et al.* Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(24): 9950-9955.
- [40] Rabinow B, Werling J, Bendele A, *et al.* Intra-articular (IA) ropivacaine microparticle suspensions reduce pain, inflammation, cytokine, and substance p levels significantly more than oral or IA celecoxib in a rat model of arthritis [J]. *Inflammation*, 2014, 38(1): 40-60.

黄芩籽种壳提取物的体外抗菌活性初步研究

杨 丽, 邓淑华, 赵桂琴*, 张晓峰

(承德医学院中药研究所, 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北省中医药抗痴呆重点研究室, 河北承德 067000)

摘要: 目的 考察黄芩籽种壳提取物是否具有体外抗菌活性, 确定黄芩籽种壳抗菌活性的有效药用部位。方法 运用倍比稀释法测定黄芩籽种壳提取物对金黄色葡萄球菌标准株、金黄色葡萄球菌临床株、白色葡萄球菌标准株以及大肠杆菌标准株的体外抗菌活性。结果 黄芩籽种壳提取物在体外对金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌以及大肠埃希氏菌均有不同程度的抗菌作用, 其中以黄芩籽种壳正丁醇萃取部位抗菌效果最为显著。结论 确定黄芩籽种壳提取物有一定的抗菌活性, 主要抗菌活性部位集中在黄芩籽种壳正丁醇萃取部位。

关键词: 黄芩; 种壳; 黄芩籽种壳提取物; 体外抗菌; 最小抑菌浓度

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2016)04-0917-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2016.04.044

黄芩籽种壳系唇形科草本植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 干燥种子的外果皮, 含有以黄酮类化合物为主的天然化学成分。目前国内外关于中草药黄芩的抗菌活性研究, 大多集中在黄芩的根和茎叶方面^[1-3]。但黄芩籽种壳多作为废弃物被填埋和焚烧, 造成了黄芩资源的极大浪费。

本实验分别选取金黄色葡萄球菌标准株和临床株、葡萄球菌标准株和大肠埃希氏菌标准株4种细菌初步对黄芩籽种壳提取物进行体外抗菌试验, 以最小抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)为指标, 测定黄芩籽种壳提取物的体外抗菌活性, 以期为扩大黄芩药用资源提供科学依据。

收稿日期: 2015-01-11

基金项目: 国家科技支撑计划(2011BAI07B04)

作者简介: 杨 丽(1989—), 女, 硕士生, 从事中草药中有效成分提取分离研究工作。Tel: 18331414581, E-mail: 1790113809@qq.com

* 通信作者: 赵桂琴(1971—), 女, 教授, 从事天然抗病毒活性产物研究与开发工作。Tel: 13932458228, E-mail: zhaoguiqin1971@sina.com