

炮制对栀子抗抑郁作用的影响及其机制研究

吴浩然¹, 黄晓燕¹, 孙广达¹, 蒋睿智¹, 单鑫^{1,2}

(1.南京中医药大学中医学院·中西医结合学院,江苏南京 210023;2.南京中医药大学翰林学院,江苏泰州 225300)

摘要:目的 以栀子不同炮制品为研究对象,比较不同炮制品栀子抗抑郁作用及其机制。方法 建立慢性不可预知性应激(CUMS)小鼠模型,并采用栀子不同炮制品水提物干预;给药结束后,采用行为学评价其抗抑郁作用的差异,并探讨其分子学机制。结果 与模型组相比,炒、焦、生栀子组小鼠糖水消耗显著升高($P<0.01$);炒、焦栀子明显降低悬尾试验($P<0.05$)和强迫游泳试验($P<0.05\sim 0.01$)的不动时间,生栀子对以上 2 者无显著改善;小鼠海马组织中炎性因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α),磷酸化核因子- κ B(p-NF- κ B)($P<0.01$)以及胶质纤维酸性蛋白(GFAP)($P<0.01$)的表达在造模后显著上升,炮制后栀子(炒、焦)抗炎作用优于生栀子。其中炒栀子抗炎作用最优,IL-1 β 、TNF- α 和 GFAP 均能被炒栀子显著下调($P<0.01$)。结论 栀子不同炮制品抗抑郁作用存在差异,其抗抑郁作用差异与其调节小鼠海马组织中炎性因子 IL-1 β 、TNF- α 等以及 GFAP 的表达有关。

关键词:栀子;抗抑郁;炮制;慢性不可预知性应激;炎性因子

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1672-0482(2020)01-0051-05

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0051

引文格式:吴浩然,黄晓燕,孙广达,等.炮制对栀子抗抑郁作用的影响及其机制研究[J].南京中医药大学学报,2020,36(1):51-55.

Anti-Depressant Effect and Its Mechanism of *Gardenia Jasminoides* Ellis Before and After Processing

WU Hao-ran¹, HUANG Xiao-yan¹, SUN Guang-da¹, JIANG Rui-zhi¹, SHAN Xin^{1,2}

(1. School of TCM Integrated Chinese and Western Medicines, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Hanlin College, Nanjing University of Chinese Medicine, Taizhou, 225300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the difference of anti-depressant effect between different processed products of *Gardenia jasminoides* Ellis, and to explore the mechanism. **METHODS** Chronic unpredictable mild stress model was established and water extract of different processed products of *Gardenia jasminoides* Ellis was used for administration. Behavioral tests were used to evaluate the difference of anti-depressant effect between different processed products of *Gardenia jasminoides* Ellis, and the molecular mechanism was further explored. **RESULTS** The immobility time of TST ($P<0.05$) and FST ($P<0.05, P<0.01$) was significantly reduced by CZZ and JZZ while there was no significant improvement in TST and FST in SZZ group. As expected, the expressions of IL-1 β , TNF- α , p-NF- κ B and GFAP were obviously higher in model group ($P<0.01$) than those in CZZ and JZZ. CZZ had the best anti-inflammatory effect by significantly decreasing the expressions of IL-1 β , TNF- α and GFAP. **CONCLUSION** The anti-depressant effects of different processed products of *Gardenia jasminoides* Ellis are different. It is assumed that the mechanism of the anti-depressant effects and its difference is related to the regulation of the expression of IL-1 β , TNF- α and GFAP in the hippocampal tissue of mice.

KEY WORDS: *Gardenia jasminoides* Ellis; anti-depressant effect; processing; CUMS; inflammatory factors

目前全球约有 3.5 亿抑郁症患者,抑郁症带来沉重的社会负担并可导致自杀,每年因抑郁症自杀死亡人数高达 100 万人。抑郁症的发病率逐年上升,预计到 2020 年将成为仅次于心脏病的第二大人类疾病^[1]。

情绪障碍在某些情况下被认为是炎症性疾病,

有证据表明,促炎细胞因子在重度抑郁患者和双相情感障碍中均有所增加^[2-4]。炎症影响神经元的生长和存活。细胞因子导致氧化应激,氧化应激损害与情绪相关的大脑区域的胶质细胞,如前额皮质和海马^[5]。最近一项对大鼠的研究发现,社交失败的易损性部分是由于前炎症过程的增加和腹侧海马

收稿日期:2019-05-17

基金项目:江苏省高校自然科学基金(18KJB360011);江苏省中医药管理局科技发展项目(YB201997)

第一作者:吴浩然,男,E-mail:18115192770@163.com

通信作者:单鑫,男,讲师,主要从事中药炮制学与抗抑郁药物研究,E-mail:shanxintcm@163.com

区^[6]的血管重构。细胞因子信号转导途径(例如 NF- κ B)导致的炎症反应,可能会进一步加剧抑郁症状^[7]。循环中促炎细胞因子水平的升高以及伴随而来的脑内小胶质细胞的激活已被证明在抑郁症的形成中发挥了作用^[8]。炎症活化的中枢神经星形胶质细胞以肥大和增殖为特征,细胞骨架胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达上调^[9]。总之,抑郁和炎症相互促进,有明确的联系^[10]。

梔子为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。具有泻火除烦、清热利湿的功效^[11]。郝文字等^[12]报道梔子粗提物能促进海马神经细胞的成熟,有助于恢复抑郁小鼠海马的结构和功能。梔子苷是从梔子果实中提取的环烯醚萜苷类化合物,是其主要活性成分^[13],具有抗炎和抗氧化活性^[14]。课题组前期对复方越鞠丸(梔子、川芎、香附、神曲、苍术)抗抑郁的研究中也发现,梔子是其发挥抗抑郁作用的关键性成分^[15]。

目前《中国药典》中载有生、炒、焦梔子 3 种制品^[11]。梔子的炮制在古籍中早有记载,《丹溪心法》有“炒令十分有二分焦黑”及“炒黑”^[16]等不同炮制程度的记载。但迄今为止,关于比较不同炮制品梔子抗抑郁作用的研究还很少,其中的生物学机制仍很复杂。因此,本研究以梔子的不同炮制品为对象,比较不同炮制品之间抗抑郁作用的差异,旨在寻找不同炮制品梔子抗抑郁作用差异的潜在机制。

1 材料

1.1 动物

雌性 BALB/c 小鼠 60 只,体质量(20±2)g,购自常州卡文斯实验动物公司,动物许可证号:SCXK(苏)2016-0010,年龄 6~8 周。动物房室温为 25℃,昼夜交替 12 h,湿度为 46%,动物正常进食饮水。所有动物程序均按照南京中医药大学动物护理与使用专业委员会批准的《实验动物护理与使用指南》进行。

1.2 药物及试剂

生梔子(SZZ)购自安徽亿源中药饮片科技有限公司,产地江西,批号:20180508。炒梔子(CZZ)、焦梔子(JZZ)药材由南京中医药大学单鑫老师制得。将生、炒、焦梔子采用水煎煮的方法,经过 2 次煎煮后,合并水煎液并滤过,用旋转蒸发仪将水煎液浓缩成每 1 mL 含生药量 0.4 g,4℃ 冰箱保存备用。给药持续 2 周。中药制剂及载体灌胃给药,剂量为每 10 g 小鼠体质量灌胃 0.1 mL(4 g/kg)。氟西汀

(FLU,古田药业,中国),溶于生理盐水,腹腔注射 20 mg/kg。RIPA 裂解液、PMSF 100 mmol/L;一抗 IL-1 β (批号:AF5103)、TNF- α (批号:AF7014)均购于 Affinity 公司、p-NF- κ B p65(批号:3039)、NF- κ B p65(批号:8242)、GFAP(批号:12389)、GAPDH(批号:5174)均购于 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 仪器

旋转蒸发仪(河南巩义矛华仪器设备有限公司),凝胶成像及分析系统(Tannon 公司),小鼠悬尾强迫游泳实验视频分析系统(上海吉量软件公司),Nanodrop2000 超微量分光光度计(Thermo 公司),蛋白电泳及转膜系统(Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 模型建立与分组

建立慢性不可预知应激性(CUMS)抑郁症模型。实验过程中,小鼠被单独饲养,每天随机接受 1 个应激源。轻度应激源包括:笼体 45° 倾斜 24 h,24 h 不进食,24 h 不饮水,湿垫 24 h,50 mL 管中约束 6 h,夜间照明(每周夜间照明 2 次)。对照组(CON)小鼠($n=10$)在正常条件下分组饲养。3 周后,使用生、炒、焦梔子水提物,氟西汀或载体每日 1 次,共 5 组($n=10$),共 2 周。同时,对照组小鼠单独使用载体给药。

2.2 行为学测试

2.2.1 糖水偏好试验 在给药 24 h 后进行测试,预先禁食禁水 24 h,在给药的最后 1 d,进行行为测试。后将所有小鼠单笼放置,同时给予小鼠 2% 蔗糖水溶液与纯水各 1 瓶,实验前称取带水瓶质量,放置 2 h 后,再次称量带水瓶质量。通过蔗糖溶液消耗量与总消耗量的比值来计算蔗糖消耗的比例。每 7 d 记录 1 次糖水偏好试验。

2.2.2 悬尾试验^[17] 小鼠尾部用胶布固定。放在通用隔音行为箱内,并倒挂于悬挂钩上,保持其尾尖距胶布大约 1 cm。小鼠为了摆脱不正常的体位而挣扎活动,活动一段时间即出现间断性不动,表现出绝望状态。记录小鼠 6 min 内的活动情况,分析后 4 min 内小鼠的不动时间作为绝望时间。

2.2.3 强迫游泳试验 将每只动物轻轻地放入 1 个高 40 cm,直径 20 cm 的透明圆柱形玻璃瓶中,装满水(23℃),强迫游泳 6 min。实验结束后,用纸巾把小鼠擦干,放回笼子里。在 6 min 的测试时间里,计算小鼠在后 4 min 漂浮在水中的静止时间。

2.3 Western blot 法检测相关蛋白的表达

小鼠在行为测试后被处死,在寒冷条件下,大脑组织立即被移除。整个海马组织在含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中裂解。依据 GFAP、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、磷酸化核因子- κ B(p-NF- κ B)和核因子- κ B(NF- κ B)的蛋白分子量,选择适当浓度的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,并将其转移到 PVDF 膜上。5%BSA 封闭 1 h 后,然后将膜分别放入预先加有一抗的抗体盒中,4 $^{\circ}$ C 冰箱摇床过夜。次日用 TBST 缓冲溶液洗膜 3 次,将 PVDF 膜分别放入加有对应二抗的抗体盒中,摇床上室温孵育 1 h, ECL 显影。采集并分析目的蛋白条带灰度值。

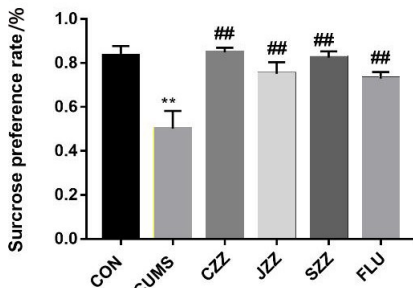
2.4 统计学方法

所有数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。使用单因素方差分析(ANOVA)和 Bonferroni 校正分析组间差异。使用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析。

3 结果

3.1 不同炮制品栀子水提取物对小鼠糖水偏好的影响

造模 3 周及之后给药期间,对照组小鼠均饮食正常,其余各组均未出现死亡现象。在 4 g/kg 的生栀子、炒栀子和焦栀子处理 2 周后进行多项行为测试。图 1 显示,与对照组相比,CUMS 小鼠的糖水偏好显著降低($P < 0.01$),提示成功诱导抑郁样行为。给药 2 周后,炒栀子、焦栀子、生栀子和氟西汀组的糖水消耗量均显著高于 CUMS 组($P < 0.01$),炒栀子的改善效果最佳。



注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,

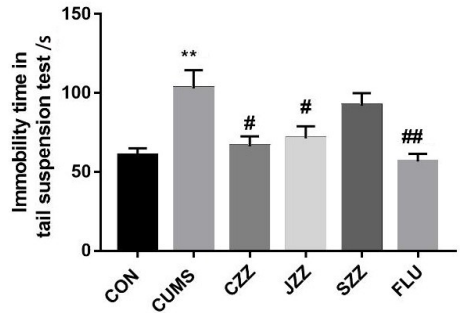
$P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 10$ 。

图 1 不同炮制品栀子水提取物对小鼠糖水偏好的影响

3.2 不同炮制品栀子水提取物对小鼠悬尾测试的影响

在悬尾测试中,CUMS 小鼠的不动时间显著高于对照组小鼠($P < 0.01$)(图 2)。炒栀子和焦栀子给药显著缩短了 CUMS 小鼠在尾悬试验中的静止

时间($P < 0.05$),氟西汀组不动时间显著降低($P < 0.01$),生栀子组小鼠的不动时间与 CUMS 小鼠无明显区别。与焦栀子相比,炒栀子更好地缩短了 CUMS 小鼠的不动时间。



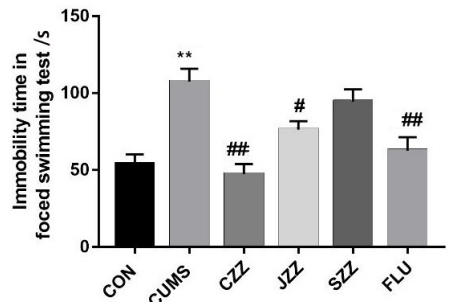
注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,

$P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 10$ 。

图 2 不同炮制品栀子水提取物对小鼠悬尾测试的影响

3.3 不同炮制品栀子水提取物对小鼠强迫游泳测试的影响

CUMS 小鼠与对照组相比,在强迫游泳实验中漂浮在水中的静止时间显著延长($P < 0.01$)(图 3)。炒栀子和焦栀子给药显著缩短了 CUMS 小鼠强迫游泳试验的静止时间($P < 0.05 \sim 0.01$),其中炒栀子的药效最好,生栀子给药无显著改善。



注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,

$P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 10$ 。

图 3 不同炮制品栀子水提取物对小鼠强迫游泳测试的影响

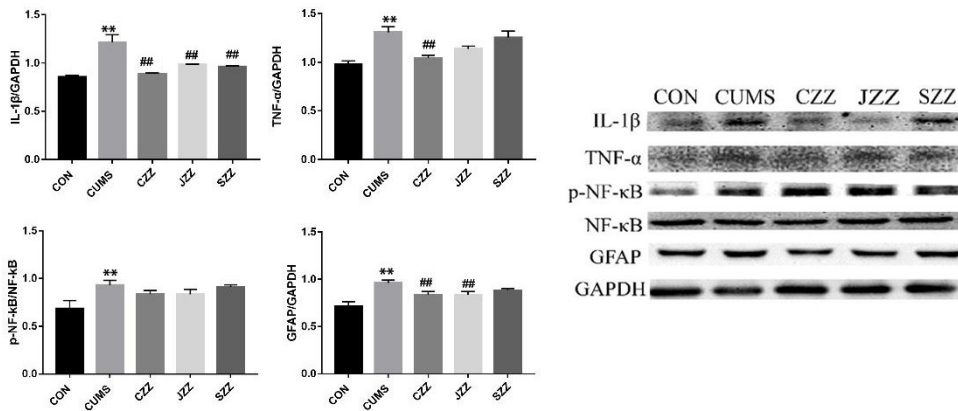
3.4 不同炮制品栀子水提取物对小鼠海马炎症水平的影响

图 4 结果显示,与对照组相比,CUMS 小鼠海马组织中促炎性因子 IL-1 β 和 TNF- α 的水平显著升高($P < 0.01$);与 CUMS 组相比,生、炒、焦栀子水提取物处理后小鼠海马组织中 IL-1 β 水平均显著降低($P < 0.01$),只有炒栀子显著下调了 CUMS 小鼠的 TNF- α 水平($P < 0.01$)。

为了进一步检测不同炮制品栀子对炎症水平的影响,我们还对小鼠海马组织中与炎症相关的 p-NF- κ B 及 NF- κ B 进行检测。与对照组相比,CUMS 小

鼠海马组织中 p-NF- κ B 的表达明显升高 ($P < 0.01$); 与 CUMS 组相比, 3 种炮制品水提物处理后,

CUMS 小鼠海马组织中的 p-NF- κ B 具有下降趋势但无统计学意义。



注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 10$ 。

图 4 IL-1 β 、TNF- α 、p-NF- κ B、GFAP 在海马中的表达情况

3.5 小鼠海马组织中 GFAP 的表达情况

图 4 结果显示, 相比对照组, CUMS 显著上调了 GFAP 的水平 ($P < 0.01$); 与 CUMS 小鼠相比, 炮制后的炒栀子和焦栀子显著下调 GFAP 的活化 ($P < 0.01$)。这可能提示中枢神经系统对于炎症的反应性降低。生栀子处理并未出现显著变化。

4 讨论

CUMS 模型使用模拟应激源在啮齿类动物中诱导抑郁^[18], 是一种被广泛应用的有效方法^[19]。CUMS 模型小鼠缺乏快乐, 运动能力和探索能力下降^[20]。在 CUMS 小鼠模型中, 行为测试缺陷是一种明显的症状, 表现为不动时间延长, 蔗糖摄入量减少^[21]。本研究中, 炒栀子和焦栀子给药后的小鼠糖水偏好显著高于 CUMS 组 ($P < 0.01$)。同时, 炒栀子和焦栀子也显著缩短了 CUMS 小鼠在悬尾试验 ($P < 0.05$) 和强迫游泳试验 ($P < 0.05 \sim 0.01$) 的不动时间。生栀子对悬尾试验和强迫游泳试验的不动时间均无显著改善, 但具有下调趋势。在我们的研究中, 氟西汀在 2 周后显示出抗抑郁效果, 而 4 g/kg 的炒栀子和焦栀子与其作用类似。以上结果说明, 不同炮制品栀子水提物对 CUMS 小鼠具有抗抑郁作用, 且炒栀子和焦栀子的药效优于生栀子, 其中以炒栀子最强。

CUMS 小鼠出现抑郁样行为的同时也伴随着海马炎症水平的升高。重度抑郁患者的 IL-1 β 水平升高, 且与抑郁症的严重程度相关^[22], 而缺乏 IL-1 受体的小鼠在承受长期压力后, 能够抵抗抑郁样行为的发生^[23], 抗抑郁药物相应降低了 IL-1 β 水平^[22]。在本研究中, 与 CUMS 小鼠相比, 炒、焦、生

栀子水提物处理后小鼠海马组织中 IL-1 β 水平均显著降低 ($P < 0.01$), 只有炒栀子显著下调了 CUMS 小鼠的 TNF- α 水平 ($P < 0.01$)。3 种炮制品水提物处理后, CUMS 小鼠海马组织中的 p-NF- κ B 均具有下降趋势但无统计学意义。炎症活化的中枢神经星形胶质细胞以肥大和增殖为特征, 细胞骨架 GFAP 表达上调^[9]。本研究中, CUMS 小鼠的 GFAP 水平在海马组织中显著升高。由此我们认为, 海马炎症水平的升高预示着反应性神经胶质增生^[24], 以及海马星形胶质细胞的激活, 进而反映出神经元的功能失调。炮制后的炒栀子和焦栀子显著下调 CUMS 小鼠 GFAP 的活化 ($P < 0.01$), 生栀子无改善作用。不同炮制品栀子水提物能够显著下调 CUMS 小鼠的炎症水平, 其中以炒栀子的抗炎作用最强。

综上所述, 应激诱导的炎症过程存在于脑中, 且 CUMS 小鼠在行为学中延长的不动时间与脑部的炎症密切相关。不同炮制品栀子水提物可以不同程度地下调 CUMS 小鼠海马的炎症水平, 这可能是其产生抗抑郁作用并存在作用差异的机制之一。

参考文献:

- [1] RIZZO LB, SWARDFAGER W, MAURYA PK, et al. An immunological age index in bipolar disorder: A confirmatory factor analysis of putative immunosenescence markers and associations with clinical characteristics[J]. Int J Methods Psychiatr Res, 2018, 27(4): e1614.
- [2] DUFFY A, HORROCKS J, DOUCETTE S, et al. Immunological and neurotrophic markers of risk status and illness development in high-risk youth: Understanding the neurobiological underpinnings of bipolar disorder[J]. Int J Bipolar Disord, 2014, 2(1): 29.
- [3] MODABBERNIA A, TASLIMI S, BRIETZKE E, et al. Cyto-

- kine alterations in bipolar disorder: A meta-analysis of 30 studies [J]. *Biol Psychiatry*, 2013, 74(1): 15-25.
- [4] NOTO C, RIZZO LB, MANSUR RB, et al. Targeting the inflammatory pathway as a therapeutic tool for major depression [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2014, 21(2/3): 131-139.
- [5] LEONARD B, MAES M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2012, 36(2): 764-785.
- [6] PEARSON-LEARY J, EACRET D, CHEN R, et al. Inflammation and vascular remodeling in the ventral hippocampus contributes to vulnerability to stress[J]. *Transl Psychiatry*, 2017, 7(6): e1160.
- [7] SLAVICH GM, IRWIN MR. From stress to inflammation and major depressive disorder: A social signal transduction theory of depression.[J]. *Psychol Bull*, 2014, 140(3): 774-815.
- [8] RIAL D, LEMOS C, PINHEIRO H, et al. Depression as a glial-based synaptic dysfunction[J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 521.
- [9] ROSENBAUM C, SCHICK MA, WOLLBORN J, et al. Activation of myenteric glia during acute inflammation *in vitro* and *in vivo*[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(3): e151335.
- [10] SHELTON RC, MILLER AH. Eating ourselves to death (and despair): The contribution of adiposity and inflammation to depression[J]. *Prog Neurobiol*, 2010, 91(4): 275-299.
- [11] 国家药典委员会.中国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:175-177.
- [12] 郝文字,杨楠,高云周,等. 栀子粗提物对抑郁模型小鼠行为学及海马神经发生的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(10): 11-14.
- [13] ZHAO C, ZHANG H, LI H, et al. Geniposide ameliorates cognitive deficits by attenuating the cholinergic defect and amyloidosis in middle-aged Alzheimer model mice[J]. *Neuropharmacology*, 2017, 116: 18-29.
- [14] XU B, LI YL, XU M. Erratum: Geniposide ameliorates TNBS-induced experimental colitis in rats via reducing inflammatory cytokine release and restoring impaired intestinal barrier function[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(5): 734.
- [15] 陶伟伟,肖东,吴浩然,等. 基于药对探讨中药复方越鞠丸抗抑郁作用配伍规律[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(9): 1314-1320.
- [16] 朱震亨.丹溪心法[M].北京:北京市中国书店,1986:215,124,133.
- [17] XUE W, WANG W, GONG T, et al. PKA-CREB-BDNF signaling regulated long lasting antidepressant activities of Yueju but not ketamine[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26331.
- [18] MONTEGGIA LM, MALENKA RC, DEISSEROTH K. Depression: The best way forward [J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 200-201.
- [19] SUN Y, GENG W, PAN Y, et al. Supplementation with *Lactobacillus kefirianofaciens* ZW3 from Tibetan Kefir improves depression-like behavior in stressed mice by modulating the gut microbiota[J]. *Food Funct*, 2019, 10(2): 925-937.
- [20] LIU Y, JIA G, GOU L, et al. Antidepressant-like effects of tea polyphenols on mouse model of chronic unpredictable mild stress[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013, 104: 27-32.
- [21] PAN Y, HONG Y, ZHANG QY, et al. Impaired hypothalamic insulin signaling in CUMS rats: Restored by icariin and fluoxetine through inhibiting CRF system[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2013, 38(1): 122-134.
- [22] HANNESTAD J, DELLAGIOIA N, BLOCH M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: A meta-analysis[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36(12): 2452-2459.
- [23] GOSHEN I, KREISEL T, BEN-MENACHEM-ZIDON O, et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression[J]. *Mol Psychiatry*, 2008, 13(7): 717-728.
- [24] GUIDA F, TURCO F, IANNOTTA M, et al. Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 67: 230-245.

(编辑:杨巍敏)