

# 慢性束缚应激抑郁症大鼠模型的复制及 逍遥散对海马色氨酸代谢途径的调节作用

焦海燕 严志祎 姜幼明 刘玥芸 陈家旭

**【摘要】** 目的 通过慢性束缚应激方法复制大鼠抑郁症模型,并观察海马色氨酸代谢途径的变化与逍遥散的调节作用。方法 将 24 只雄性 SD 大鼠随机分成正常组、模型组、逍遥散组与氟西汀组。采用 21 天慢性束缚应激的方法复制大鼠抑郁症模型,通过大鼠体重变化、糖水偏好实验、新环境抑制进食实验、旷场试验对模型进行评价。采用 ELISA 法测定各组大鼠海马色氨酸 (tryptophan, Trp) 与 5-羟色胺 (5-HT) 的含量。结果 模型组大鼠糖水偏好量和新环境进食时间与正常组大鼠相比有显著差异 ( $P < 0.01$ ); 旷场试验的中央区进入次数、中央区停留时间以及总穿格次数与正常组相比均有统计学差异 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。ELISA 结果显示,模型组大鼠海马 5-HT 含量显著低于正常组 ( $P < 0.01$ ), 而逍遥散组和氟西汀组海马 5-HT 含量明显高于模型组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 模型组大鼠海马中色氨酸的含量较正常组明显增加 ( $P < 0.01$ )。结论 在慢性束缚应激抑郁症大鼠海马中存在色氨酸代谢途径的异常,这与抑郁症的发病密切相关,且逍遥散能够通过海马色氨酸代谢的调节起到一定的抗抑郁作用。

**【关键词】** 抑郁症; 色氨酸代谢途径; 5-羟色胺; 逍遥散

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.11.003

**Model of depression rats with chronic immobilization stress and effects of Xiaoyaosan on the change of tryptophan metabolism pathway** JIAO Haiyan, YAN Zhiyi, JIANG Youming, et al. Institute of TCM, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China  
Corresponding author: CHEN Jiayu, E-mail: chenjx@bucm.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To establish the depression rat model by chronic immobilization stress method, and observe the change of tryptophan metabolism pathway in hippocampus and the regulation of Xiaoyaosan. **Methods** 24 SD rats were randomly divided into normal group, model group, Xiaoyaosan group and fluoxetine group, the 21 days depression rat model was made by chronic immobilization stress method, and the model was evaluated by bodyweight change, sucrose preference test, novelty suppressed feeding test and open field test. ELISA method was used to determine the contents of tryptophan and 5-HT in hippocampus. **Results** The results of sucrose preference test and novelty suppressed feeding test showed that there was a significant difference between model group and normal group ( $P < 0.01$ ), the central entrance, central residence and total cross number of rats in model group were significantly different compared with that of normal group ( $P < 0.01, P < 0.05$ ). The ELISA results showed that the content of 5-HT in hippocampus of rats in model group was significantly lower than that of normal group ( $P < 0.01$ ), the contents of 5-HT of rats in Xiaoyaosan group and fluoxetine group were significantly higher than that of model group ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); the content of tryptophan in model group was significantly higher than

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81473597); 国家自然科学基金重点项目(81630104); 北京中医药大学 2016 年校级自主课题(2016-JYB-XS012)

作者单位: 100029 北京中医药大学中医学院[焦海燕(硕士研究生)、严志祎(博士研究生)、姜幼明、刘玥芸、陈家旭]

作者简介: 焦海燕(1991-), 女, 2014 级在读硕士研究生。研究方向: 证候的生物学基础。E-mail: 2548489775@qq.com

通信作者: 陈家旭(1966-), 博士, 教授, 博士生导师。研究方向: 证候的生物学基础。E-mail: chenjx@bucm.edu.cn

normal group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** There existed abnormality in the tryptophan metabolic pathway of depression model rat by chronic immobilization stress, which was closely related to the incidence of depression, and *Xiaoyaosan* could possess antidepressant effect by regulating the tryptophan metabolism in hippocampus.

**【Key words】** Depression; Tryptophan metabolism pathway; 5-HT; *Xiaoyaosan*

抑郁症是一种以显著而持久的心境低落为主要特征的情感障碍类精神疾病,其典型表现有情绪低落、思维迟钝、对工作失去兴趣、语言动作减少、不思饮食、负罪感以及自觉无用、有自杀倾向等。抑郁症的发病机制尚不明确,目前临床上运用的抗抑郁药主要是基于“单胺类神经递质假说”研发,虽具有一定治疗效应,但存在效率低、起效慢等缺点。中医学对抑郁症的认识较早,但并没有抑郁症之病名,古代文献多把它归在郁证中,属中医学情志病范畴。抑郁症中医证候要素研究表明抑郁症的病位在肝和脾,主要病性为气郁、气虚<sup>[1]</sup>,肝失疏泄,脾失健运,脏腑气机紊乱,阴阳失调等是郁证的主要病机<sup>[2]</sup>。肝郁脾虚证为抑郁症的常见证型,而逍遥散作为疏肝健脾的名方,在对抑郁症治疗方面有较好的理论及临床基础。本实验通过慢性束缚应激的方法复制大鼠抑郁症模型,通过糖水偏好实验、新环境抑制进食实验及旷场实验对模型进行评价。采用 ELISA 法检测大鼠海马色氨酸与 5-HT 的含量,并观察逍遥散对中枢色氨酸代谢的影响,探索抑郁症的中枢机制,以期进一步为逍遥散抗抑郁作用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体重(200±20)g,共 24 只。所有大鼠在开始进行实验前于北京中医药大学动物三级实验室适应性饲养 7 天,室温为(22±2)℃,相对湿度 60%±5%,环境保持安静,正常光照、昼夜节律。动物许可证号:SCXK(Beijing)2012-0001。

### 1.2 药物

逍遥散出自《太平惠民和剂局方》(北柴胡 30 g、茯苓 15 g、当归 30 g、白芍 30 g、白术 30 g、生姜 10 g、炙甘草 15 g、薄荷 10 g),购自北京同仁堂饮片有限责任公司,由中日友好医院中药制剂室按照原方配伍比例煎煮、浓缩成药粉,1 g 药粉含生药量 3.18 g,使用时需用去离子水配制成混悬液。盐酸氟西汀胶囊(Patheon France)规格为 20 mg/粒,购自

礼来苏州制药有限公司。

### 1.3 主要试剂和仪器

大鼠束缚架(自制),旷场箱(自制),WV-CP470 摄像头(Panasonic, Japan),ACS-2EAS 型电子秤(北京市菲姆斯科技开发公司),Etho Vision3.0 分析软件(Noldus),Serotonin ELISA kit(Enzo),Tryptophan ELISA kit(Abnova),低温高速离心机(Eppendorf),37℃恒温箱(BINDER),全波长扫描酶标仪(Thermo Scientific)。

### 1.4 模型制备

采用体重随机数分组法对 24 只 SD 大鼠进行随机分组,分为正常组、模型组、逍遥散组、氟西汀组,共 4 组,每组 6 只。采用 21 天慢性束缚应激的方法复制大鼠抑郁症模型,大鼠束缚架底座为长 20 cm、宽 10 cm、厚 1 cm 木质结构,上方束缚台长 22 cm,宽 6.6 cm,束缚台的两侧各有两条可以调节的粘贴带,用来束缚实验大鼠的胸腹部。

正常组大鼠采用常规方法饲养,不对其进行造模,其余 3 组大鼠每天束缚 3 小时。每日于束缚前 1 小时对模型组大鼠灌服去离子水,逍遥散组大鼠灌服逍遥散混悬液,氟西汀组灌服氟西汀溶液,并按人体有效用药剂量进行换算。逍遥散给药量为每 100 g 大鼠体重给药 0.61 g,氟西汀给药量为每 100 g 体重 0.2 mg,大鼠的灌胃容积为每 100 g 体重 1 mL。造模持续 21 天。通过观察大鼠体重变化,并采用糖水偏好实验、旷场实验、新环境抑制进食实验对大鼠抑郁症模型进行评价。

### 1.5 取材

造模结束后进行取材:首先用 10% 水合氯醛注射大鼠腹腔,使其处于深度麻醉状态,冰上取脑组织并分离海马,每只大鼠称取 100 mg 海马组织放置在 1.5 mL EP 管中,然后加入 1000 μL 已经预冷的 1×PBS 溶液,匀浆后存放于-20℃冰箱,反复冻融 2 次后,于 4℃,5000 r/min 条件下离心 5 分钟,分装所得蛋白上清液存放在-80℃冰箱备用。

### 1.6 ELISA 实验

1.6.1 5-HT 含量测定 实验前将 Serotonin ELISA kit 试剂盒从 4℃冰箱取出,放至室温后把所用试剂

离心混匀;将 500  $\mu\text{L}$  浓度为 500  $\text{ng/mL}$  的蛋白标准品原液分别稀释为 125、31.25、1.95、0.49  $\text{ng/mL}$  4 个浓度;打开 96 孔板,根据加样顺序分别加入缓冲液和标准品溶液,每个待测样品三个复孔,每孔 100  $\mu\text{L}$ ;加入 5-HT 抗体,用封板膜将 96 孔板密封,室温下摇床孵育 2 小时,清洗 3 次后通过拍打除去 96 孔板中残留液体;加入显影液和终止液后立刻在酶标仪下进行读数,得到各孔的 OD 值,然后通过标准品的 OD 值绘制出 5-HT 蛋白浓度的标准曲线,计算出各个样品蛋白含量,结果和海马重量进行换算,得到 5-HT 的含量和海马组织的质量比,以“ $\text{ng/mg}$ ”表示。

**1.6.2 色氨酸含量测定** 提前将 Tryptophan ELISA kit 试剂盒从冰箱拿出,放至室温,并把所用试剂离心、混匀;然后将 25  $\mu\text{L}$  蛋白标准品 Standard A-F (浓度依次为 0、2.5、7.5、25、75、250  $\mu\text{g/mL}$ )、待测样品和对照蛋白品分别加入 96 孔板的相应孔,每个样品 3 个复孔;加入 50  $\mu\text{L}$  色氨酸抗体,4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;结束后倒掉板中液体,加入清洗液清洗 3 次,通过拍打除去残留液体;加入酶标抗体工作液,孵育 30 分钟后倒掉板中液体,加入清洗液清洗;加入显影液,室温避光孵育 30 分钟后加入终止液,混匀后立刻在酶标仪下读数,得到各孔的 OD 值,然后通过标准品的 OD 值绘制色氨酸蛋白浓度的标准曲线,计算样品蛋白含量,再与海马组织重量进行换算,得到色氨酸的含量和海马的质量比,以“ $\text{ng/mg}$ ”表示。

### 1.7 统计学处理

数据以均值 $\pm$ 标准误( $\bar{x}\pm\text{sem}$ )来表示。使用 SPSS 21.0 软件进行方差齐性检验和正态性检验,并用单因素方差分析(One-Way ANOVA)统计数据,以  $P<0.05$  视为差异有统计学意义。运用 prism 6.0 和 Excel 软件进行制图。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠体重变化情况

在造模开始时,各组大鼠的体重差异无统计学

意义;造模第 7 天,模型组大鼠体重较正常组与氟西汀组大鼠明显降低( $P<0.01$ );造模第 14 天和 21 天结果显示,正常组、逍遥散组和氟西汀组大鼠体重显著高于模型组( $P<0.01$ )。见表 1。

### 2.2 糖水偏好实验和新环境抑制进食实验结果

糖水偏好实验的结果显示,模型组大鼠的糖水消耗率低于其余三组,差异显著( $P<0.01$ )。新环境抑制进食实验结果表明,模型组大鼠的进食时间明显较正常组显著延长( $P<0.01$ ),逍遥散组与氟西汀组大鼠进食时间与模型组大鼠无统计学差异。见表 2。

表 2 各组大鼠糖水偏好与新环境抑制进食实验结果( $\bar{x}\pm\text{sem}$ )

组别	<i>n</i>	糖水偏好(%)	新环境抑制进食(s)
正常组	6	0.83 $\pm$ 0.01	153.22 $\pm$ 10.71
模型组	6	0.58 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	237.33 $\pm$ 22.92 <sup>a</sup>
逍遥散组	6	0.74 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	227.23 $\pm$ 16.31
氟西汀组	6	0.76 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	210.62 $\pm$ 10.71

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

### 2.3 旷场实验结果

中央区进入次数:造模开始前,各组大鼠中央区进入次数经过计数无明显差异;造模第 21 天,模型组大鼠中央区进入次数显著低于其余三组( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。中央区停留时间:造模开始前,各组大鼠中央区停留时间并无明显差异;造模第 21 天,模型组大鼠中央区停留时间显著高于逍遥散组、正常组和氟西汀组大鼠( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。总穿格数:造模开始前,各组大鼠总穿格数并无明显差异;造模第 21 天,模型组大鼠总穿格数明显低于正常组和逍遥散组大鼠,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 3。

### 2.4 各组大鼠海马色氨酸与 5-HT 的含量

5-HT 蛋白浓度标准曲线为  $y = -0.129\ln(x) + 0.9394$ ,  $R^2 = 0.995$ ;色氨酸蛋白浓度标准曲线为  $y = -0.148\ln(x) + 1.0092$ ,  $R^2 = 0.993$ 。

与正常组相比,模型组大鼠海马 5-HT 含量显

表 1 各组大鼠体重比较( $\bar{x}\pm\text{sem}$ ,g)

组别	<i>n</i>	第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
正常组	6	215.47 $\pm$ 4.06	305.75 $\pm$ 5.81	349.44 $\pm$ 6.73	366.86 $\pm$ 7.67
模型组	6	220.02 $\pm$ 2.62	266.77 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup>	294.91 $\pm$ 2.53 <sup>a</sup>	322.37 $\pm$ 2.08 <sup>a</sup>
逍遥散组	6	220.18 $\pm$ 3.22	270.32 $\pm$ 4.38	327.87 $\pm$ 6.35 <sup>b</sup>	354.47 $\pm$ 6.55 <sup>b</sup>
氟西汀组	6	220.77 $\pm$ 2.59	300.95 $\pm$ 3.38 <sup>b</sup>	334.51 $\pm$ 4.03 <sup>b</sup>	364.46 $\pm$ 5.87 <sup>b</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

著降低 ( $P < 0.01$ ), 而逍遥散组和氟西汀组海马 5-HT 含量明显高于模型组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与其余三组相比, 模型组大鼠海马的色氨酸蛋白含量最高, 有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 3 各组大鼠旷场实验结果 ( $\bar{x} \pm sem$ )

组别	n	中央区进入次数(次)	中央区停留时间(s)	总穿格数(次)
正常组	6			
第 0 天		6.43±1.32	11.91±1.13	138.41±6.99
第 21 天		5.86±0.74	8.74±1.33	114.92±13.82
模型组	6			
第 0 天		7.85±1.12	12.84±1.86	147.52±6.68
第 21 天		1.86±0.32 <sup>b</sup>	14.22±0.58 <sup>b</sup>	81.02±5.82 <sup>a</sup>
逍遥散组	6			
第 0 天		7.31±0.64	15.05±1.27	144.13±5.04
第 21 天		3.53±0.39 <sup>c</sup>	10.53±1.07 <sup>c</sup>	111.69±10.58 <sup>c</sup>
氟西汀组	6			
第 0 天		5.86±0.62	12.52±1.87	141.63±5.50
第 21 天		4.31±0.64 <sup>d</sup>	9.31±1.16 <sup>d</sup>	98.12±9.84

注: 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ 。

表 4 各组大鼠 5-HT 和色氨酸蛋白含量 ( $\bar{x} \pm sem, ng/mg$ )

组别	n	5-HT	色氨酸(TRP)
正常组	6	0.397±0.044	12.209±0.033
模型组	6	0.194±0.008 <sup>a</sup>	13.843±0.032 <sup>a</sup>
逍遥散组	6	0.293±0.025 <sup>b</sup>	12.137±0.043 <sup>c</sup>
氟西汀组	6	0.326±0.026 <sup>c</sup>	11.933±0.197 <sup>c</sup>

注: 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

本研究通过慢性束缚应激的造模方法复制抑郁症大鼠模型, 选用逍遥散作为干预药物, 并以西药氟西汀为对照药物。从大鼠体重的统计结果可以看出, 模型组大鼠与其余三组大鼠的体重差异逐渐增加, 表明束缚应激对大鼠的体重有较大影响。糖水偏好实验作为公认的抑郁样行为评价方法, 通过测定大鼠对糖水的偏好程度, 判断大鼠精神状态与抑郁程度<sup>[3]</sup>。本实验结果模型组大鼠对糖水的偏好程度显著低于正常组, 表明了其抑郁样行为的发生。新环境抑制进食实验则是通过实验动物在陌生环境中进食所需的时间来判断动物的精神、行为改变<sup>[4]</sup>, 本实验模型组大鼠在新环境中的进食时间较正常组大鼠明显延长, 进一步反映了模型大鼠的抑郁样改变。旷场实验是用来评价动物处在陌生环境中时所产生的自主探究行为

的一种实验方法, 常用于抑郁症的模型评价<sup>[5]</sup>。本研究选取大鼠中央区进入次数、中央区停留时间以及总穿格次数进行了分析, 当大鼠处于焦虑或抑郁状态时, 在其活动时会自动避开空旷的中央区域, 选择在相对安全的旷场箱体四周活动, 减少进入中央区的次数, 而当大鼠一旦进入开阔的中央区域时, 出现抑郁样改变的大鼠会对向四周移动产生迟疑, 从而增加了中央区停留时间。总穿格次数则主要反映了实验动物的运动情况, 当动物精神抑郁时自主活动的欲望及运动能力也会随之下降。在本实验中, 与正常组相比, 模型组大鼠的中央区进入次数、中央区停留时间及总穿格次数均有显著差异, 这表明慢性束缚应激导致的模型大鼠出现了抑郁样的行为改变, 再根据体重变化、糖水偏好以及新环境抑制进食实验的结果可以推断, 21 天慢性束缚应激大鼠抑郁症模型的复制基本成功。另外, 从实验结果可以看出, 逍遥散对慢性束缚应激抑郁症模型大鼠的体重和行为表达均有一定的调节作用。

有研究表明, 抑郁症是由脑内去甲肾上腺素与 5-HT 缺乏所致<sup>[6]</sup>, 中枢 5-HT 活性的降低可增加机体对外界应激的敏感性, 产生精神状态的改变, 从而引起抑郁、焦虑等。5-HT 是色氨酸代谢途径中最重要的一种中间产物, 当机体因应激而引起代谢速度加快时, 可导致色氨酸水平降低, 进而使 5-HT 的含量随之下降, 引起精神疾患的发生<sup>[7]</sup>。从本研究的结果可以看出, 模型组大鼠海马内色氨酸的含量升高, 而 5-HT 的含量下降, 说明应激可能抑制了海马内色氨酸生成 5-HT 的代谢途径; 逍遥散对抑郁症模型大鼠海马内色氨酸代谢及 5-HT 的合成均有一定调节作用, 表明逍遥散能使色氨酸更多地向 5-HT 方向转化, 对 5-HT 系统功能紊乱有一定的恢复作用, 以此发挥抗抑郁的治疗作用。

综上所述, 本研究成功复制了大鼠抑郁症模型, 并通过 ELISA 测定了慢性束缚应激抑郁症大鼠海马 5-HT 与色氨酸的蛋白含量, 进一步论证了海马内色氨酸和 5-HT 含量的变化与抑郁症发病的关联性。逍遥散作为治疗情志疾病的经典方剂, 对海马色氨酸代谢途径以及 5-HT 的含量均有调节作用。脑内 5-HT 含量减少与情绪改变以及精神疾患的发生密切相关<sup>[8]</sup>, 因而对色氨酸代谢与 5-HT 合成的深入研究能够进一步为抑郁症的发病机理, 以

及逍遥散治疗抑郁症的临床应用提供更完善的科学依据。

### 参 考 文 献

- [1] 李那永. 抑郁症中医证候要素及其分布特征研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [2] 郭保全, 石长珍. 老年抑郁症治疗体会[J]. 国医论坛, 2004, 19(4): 28.
- [3] Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology*, 1987, 93(3): 358-364.
- [4] Shalom G, Lifschytz T, Lerer B, et al. Effects of T3 and fluoxetine in the novelty-suppressed feeding test model of depression and anxiety: gender differences [J]. *European Neuropsychopharmacology*, 2006, 16(6): S48-S49.
- [5] Hallam KT, Horgan JC, Norman TR. An investigation of the effect of tacrine and physostigmine on spatial working memory deficits in the olfactory bulbectomised rat [J]. *Behavioural Brain Research*, 2004, 153(2): 481-486.
- [6] Castern E. Is mood chemistry [J]. *NatRevNeurosci*, 2005, 6(3): 241-246.
- [7] Varea V, de Carpi J M, Puig C, et al. Malabsorption of carbohydrates and depression in children and adolescents [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005, 40(5): 561-565.
- [8] Korzan W J, Summers C H. Serotonergic response to social stress and artificial social sign stimuli during paired interactions between male *Anolis carolinensis* [J]. *Neuroscience*, 2004, 123(4): 835-845.

(收稿日期: 2017-04-21)

(本文编辑: 董历华)