

百合多糖与黄芪多糖联用对慢性应激小鼠抑郁行为的影响及机制

刘佳蕾, 王宇亮, 赵宏, 沈宇, 王朝兴, 李爽, 孙诗晴, 周子筠, 张宇*
(佳木斯大学药学院, 黑龙江省新药创制与药效毒理学评价重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154000)

[摘要] 目的:探究百合多糖(LLP)与黄芪多糖(APS)联合发挥抗抑郁作用的机制。方法:60只KM小鼠随机分为空白组,模型组,盐酸氟西汀($8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,LLP($0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,APS($0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和多糖联用(LLP+APS, $0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}+0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组10只。除空白组外,其余各组均给予慢性不可预知温和应激(CUMS)诱导小鼠抑郁模型,造模第29天,盐酸氟西汀组按相应剂量灌服盐酸氟西汀,各多糖组小鼠灌服相应药物。以小鼠体质量变化、旷场实验、糖水偏爱实验等指标评价小鼠抑郁行为;尼式染色法观察海马CA1区神经元形态变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测脑组织及血浆中5-羟色胺(5-HT)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT)的含量变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测腺苷酸环化酶/环磷酸腺苷/蛋白激酶A(AC/cAMP/PKA)信号通路相关蛋白的表达水平。结果:与空白组比较,模型组小鼠体质量增长缓慢,运动总距离、中心运动距离及糖水偏爱率显著降低($P<0.01$),抑郁行为显著,且海马神经元细胞受损严重,5-HT含量显著降低($P<0.01$),ACTH和CORT含量显著升高($P<0.01$),腺苷酸环化酶6(ADCY6),PKA,cAMP反应元件结合蛋白-1(CREB-1)及脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白表达水平显著下降($P<0.01$);与模型组比较,LLP组,ASP组和LLP+APS组小鼠抑郁行为均有显著改善($P<0.01$),其中LLP+APS抗抑郁作用优于单一多糖,各给药组均能不同程度的缓解海马神经元细胞损伤,显著增加脑组织内5-HT含量($P<0.01$),明显降低血浆中ACTH和CORT水平($P<0.05$),大幅度上调ADCY6,PKA,CREB-1,BDNF蛋白水平($P<0.05$)。结论:LLP和APS联用后抗抑郁效果显著增强,具有良好的正协同性,其作用机制可能与影响神经递质含量、抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)活性、激活AC/cAMP/PKA信号转导通路密切相关。

[关键词] 百合多糖; 黄芪多糖; 慢性不可预知温和应激; 抑郁症; 环磷酸腺苷(cAMP)信号转导通路

[中图分类号] R2-0;R285;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)05-0062-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220539

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220106.1220.002.html>

[网络出版日期] 2022-01-06 16:39

Effect and Mechanism of Lily Polysaccharide Combined with Astragalus Polysaccharide on Depressive Behavior in Chronic Stress Mice

LIU Jia-lei, WANG Yu-liang, ZHAO Hong, SHEN Yu, WANG Chao-xing, LI Shuang, SUN Shi-qing,
ZHOU Zi-jun, ZHANG Yu*

(Key Laboratory of New Drug Discovery and Efficacy Toxicology Evaluation, Institute of Pharmacy,
Jiamusi University, Jiamusi 154000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of antidepressant effect of lily polysaccharide (LLP) and astragalus polysaccharide (APS). **Method:** Sixty KM mice were randomly divided into blank group, model group, fluoxetine hydrochloride ($8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, LLP ($0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, APS ($0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group and polysaccharide combination (LLP+APS, $0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}+0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, with 10 mice in each group. Except the

[收稿日期] 20211010(005)

[基金项目] 中央支持地方高校改革发展基金项目(2019zyzcd-f-01);黑龙江省北药与功能食品特色学科建设项目(2018-TSXX-02);佳木斯大学优秀学科团队项目(JDXKTD-2019005);黑龙江省教育厅基本科研业务费基础研究项目(2017-KYYWF-0590)

[第一作者] 刘佳蕾,在读硕士,从事天然产物多糖对精神障碍疾病的防治研究,E-mail:Liujialei961205@163.com

[通信作者] *张宇,硕士,教授,从事天然药物活性成分筛选及新药开发研究,E-mail:zhangyu@jmsu.edu.cn

blank group, the other groups were given chronic unpredictable mild stress (CUMS) induced mouse depression model. On the 29th day of modeling, fluoxetine hydrochloride group was given corresponding dose of fluoxetine hydrochloride, and polysaccharide groups were given corresponding drug. The depressive behavior of mice was evaluated by behavioral indexes such as body mass change, open field test. The morphological changes of hippocampal CA1 neurons were observed by Nissl staining. The contents of 5-hydroxytryptamine (5-HT), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and corticosterone (CORT), in brain tissue and plasma were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was used to detect the expression levels of related proteins in adenylate cyclase/cyclic adenylate phosphate/protein kinase A (AC/cAMP/PKA) signal pathway. **Result:** Compared with the blank group, mice in the model group gained weight slowly, the total distance, central distance and sugar water preference rate decreased significantly ($P<0.01$), the depressive behavior was significant, the hippocampal neurons were seriously damaged, the content of 5-HT decreased ($P<0.01$), the contents of ACTH and CORT increased significantly ($P<0.01$), adenylate cyclase 6 (ADCY6), PKA and cAMP response element binding protein-1 (CREB-1) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein expression decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the model group, depressive behavior of mice in LLP group, APS group and LLP+APS group was significantly improved ($P<0.01$). The antidepressant effect of LLP+APS was better than that of LLP and APS. Each administration group could alleviate the damage of hippocampal neurons in varying degrees, significantly increase the content of 5-HT in brain tissue ($P<0.01$), and reduce the levels of ACTH and CORT in plasma ($P<0.05$). The protein levels of ADCY6, PKA, CREB-1 and BDNF were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** The antidepressant effect of LLP+APS is significantly enhanced and has a synergistic effect. The mechanism may be closely related to affecting the content of neurotransmitters, inhibiting HPA axis activity and activating AC/cAMP/PKA signal transduction pathway.

[Keywords] lily polysaccharide; astragalus polysaccharide; chronic unpredictable mild stress; depression; cyclic adenylate phosphate (cAMP) signal transduction pathway

在科技和经济飞速发展的同时,来自工作、生活和社会的压力也随之攀升,抑郁症逐步走入人们的视线。其临床表现主要为持久性心境低落,同时伴有快感消失、失眠焦虑等症状,严重者还有着极高的自杀倾向。抑郁症的发病率高达4.7%,不仅治愈率低且易反复发作,据世界卫生组织(WHO)预测,到2030年抑郁症将成为全球首要的疾病负担^[1-3]。目前临床上多以神经递质再摄取抑制剂结合心理疏导进行治疗,但部分患者对此类药物敏感度较低,无法立即产生治疗作用。长期服用后,不仅药物依赖性高还会造成性功能障碍等不良反应^[4-5]。因此,寻找低毒高效、适宜长期服用的抗抑郁新药是医药领域亟待解决的问题。近年来,众多研究者将目光转向了历史悠久、药效明确的中药治疗。中医认为肝气郁结、气虚是郁证的关键病机,因此中医对待郁证常以宁心安神、疏肝理气为主,再辅以滋阴补气类药物进行治疗。

百合是我国首批通过的药食同源药材之一,性味甘,寒。归心、肺经。具有养阴润肺,清心安神的功效^[6-7]。其入药历史悠久,在“百合知母汤”“百合

地黄汤”等抗抑郁经典名方中皆作为主药发挥着重要的作用^[8-10],现代研究表明,百合中富含多糖、甾体皂苷及生物碱等多种活性成分。已有研究证实百合皂苷具有良好的抗抑郁作用,众多研究者对其展开了深层次的研究,而百合多糖(LLP)同样为百合的主要成分之一,具有抗炎、抗氧化、调节免疫等作用,其抗抑郁作用亦不容忽视^[11-12]。百合性寒,临床上常与其他药物配伍使用。在“养心舒脉方”“清脑复神液”和“雪莲归芪口服液”等临床治疗抑郁症的药物中,均可发现百合常与黄芪配伍。黄芪甘,温,归肺、脾经,具有益气补中、利水消肿之功效,常用于气虚乏力,食少便溏等证^[6]。研究发现黄芪多糖(APS)在抗炎、保肝和抗氧化方面作用显著,并且对神经细胞的保护作用尤为突出,具有良好的抗抑郁活性^[13-14]。两种多糖均有不同程度的抗抑郁活性,二者联合使用是否产生协同作用,其机制如何是本课题要解决的关键问题。目前国内外对多糖的研究多集中于单一多糖的结构解析、药理活性等,对复合多糖的研究较少。而关于LLP与APS联用的研究还未见报道。因此本课题将APS与LLP

按一定比例联用,观察其对慢性应激小鼠抑郁样行为的影响及对腺苷酸环化酶/环磷酸腺苷/蛋白激酶A(AC/cAMP/PKA)信号通路的调控作用,研究其可能的作用机制,并结合前期实验对多糖结构的解析,分析联用多糖药效增强可能的原因,探讨联用多糖抗抑郁活性与其组成成分的相关性。为解决中药配伍作用成分不明确和单一多糖活性具有局限性的问题奠定实验基础,为今后抑郁症的治疗方案提供新的思路。

1 材料

1.1 动物 70只SPF级雄性KM小鼠,体质量18~22 g,购于长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,合格证号SCXK(吉)2020-0002。小鼠饲养于佳木斯大学实验动物中心,温度(22±2)℃,湿度(55±10)%,12 h明暗交替。本研究经过佳木斯大学动物伦理委员会批准,批准编号JMSU-234。

1.2 药物及试剂 百合购自哈药集团世一堂有限责任公司(批号170801),黄芪购自黑龙江省佳木斯市同仁堂大药房(批号170801),经佳木斯大学药学院张宇教授鉴定分别为百合科植物卷丹 *Lilium lancifolium* 的干燥肉质鳞叶和豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根;盐酸氟西汀胶囊(山西仟源医药集团股份有限公司,批号201006);5-羟色胺(5-HT),促肾上腺皮质激素(ACTH),皮质酮(CORT)试剂盒(北京安迪华泰科技有限公司,批号均为AD202103);甲苯胺蓝染色液(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号G1032);兔抗小鼠腺苷酸环化酶6(ADCY6),PKA,cAMP反应元件结合蛋白-1(CREB-1),脑源性神经营养因子(BDNF), β -肌动蛋白(β -actin)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为bs-3923R,bs-0520R,bs-0035R,bs-0248R,bs-0061R);辣根过氧化物酶(HRP)标记大鼠免疫球蛋白(Ig)G(北京博奥森生物技术有限公司,批号bs-0293P-HRP)。

1.3 仪器 自制旷场行为观察箱、强迫游泳装置、悬尾装置,Any-maze动物行为学分析系统(美国Stoelting公司);Donatello型脱水机(意大利Diapath公司);JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);ABS型酶标仪(美谷分子仪器有限公司);H1650R型高速冷冻离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司);RM2016型病理切片机,DM750型生物显微镜(德国Leica公司);JA型电子精密天平(上海精天电子仪器有限公司);SCIENTZ-950E型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份

有限公司);Tanon-5200Multi凝胶成像系统,EP-300型电泳仪(上海天能科技公司)。

2 方法

2.1 药物制备及给药 LLP,APS均按照课题组前期研究进行制备,参照药典记载的适宜用量并根据“人与动物按体表面积折算的等效剂量比值表”计算给药剂量及前期实验研究^[12-13],设定盐酸氟西汀给药剂量为8 mg·kg⁻¹,LLP与APS给药剂量均为0.2 g·kg⁻¹,为消除给药剂量对实验结果的影响,多糖联用(LLP+APS)组剂量设为0.2 g·kg⁻¹(0.1 g·kg⁻¹+0.1 g·kg⁻¹),每日给药1次。LLP,APS,LLP+APS组剂量分别相当于生药量12,27,21 g·kg⁻¹,按人的标准体质量70 kg计算临床用量,其剂量相当于临床用量的1.17,0.51,0.67倍。

2.2 模型复制与分组 健康雄性KM小鼠适应性喂养7 d,于分组前对小鼠进行糖水适应性训练,次日禁水不禁食24 h后,进行糖水偏爱实验,剔除对蔗糖水过于敏感或极度不喜爱的小鼠,采用随机数字表法,将剩余小鼠随机分为6组($n=10$),采用慢性不可预知温和刺激(CUMS)方法复刻抑郁模型。除空白组外,其余各组均接受56 d随机性温和刺激:禁食24 h,禁水24 h,潮湿垫料24 h,40℃热水游泳5 min,束缚2 h,摇晃鼠笼15 min,昼夜颠倒24 h,4℃冰水游泳5 min,45°倾斜鼠笼24 h,夹尾1 min。一种造模方法不可连续2 d重复出现,在给药治疗前对全部小鼠进行行为学测试,通过旷场实验运动距离缩短、糖水偏爱率降低等指标判断模型建立成功^[15-17],于造模第29天依据阳性药物临床治疗周期及相关文献^[18-19],采用灌胃给药的方法,按2.1项下所述剂量治疗28 d,空白组和模型组小鼠给予相应的生理盐水。

2.3 小鼠一般情况观察 实验期间观察小鼠饮水量、毛色光滑度及精神状态,每隔7 d对小鼠进行体质量测定,并绘制小鼠体质量增长曲线。

2.4 行为学指标检测小鼠抑郁样行为 于实验末尾2 d,给予刺激前对小鼠行为学指标进行观察,包括小鼠旷场实验:将小鼠放入50 cm×50 cm×40 cm的旷场箱中观察6 min,用相机拍摄后5 min内小鼠运动轨迹,将视频上传至Any-maze动物行为学分析系统,分析其运动总距离和在中央区域运动所占的百分比[中央区域运动所占百分比(%)=中央区运动距离/运动总距离×100%];强迫游泳实验(FST):室温下将小鼠置入深为20 cm的温水中观察6 min,记录其后5 min内的累计不动时间;悬尾实验(TST):

将小鼠倒挂于距地面5 cm的高台上观察6 min,当小鼠四肢不再剧烈挣扎即视为静止不动,记录其后5 min内的累计不动时间;糖水偏爱实验:造模第55天禁水不禁食24 h,次日给予1%蔗糖水和纯水各1瓶,3 h后记录蔗糖水和纯水的消耗量,计算糖水偏爱率。糖水偏爱率=蔗糖水消耗量/(蔗糖水消耗量+纯水消耗量)×100%。

2.5 尼氏染色观察小鼠海马神经元的形态 行为学实验结束后,水合氯醛麻醉小鼠,剪开胸廓暴露其心脏,从心尖入针至左心室,缓缓注射生理盐水,直至血液冲净,将生理盐水换为4%多聚甲醛溶液,待小鼠肢体僵硬即可停止。取全脑置于4%多聚甲醛溶液中保存备用。12 h后将其取出,冲水并迅速剥离出海马,将海马组织蜡块切片,二甲苯脱蜡至完全透明,甲苯胺蓝染液浸染5 min,蒸馏水洗,梯度乙醇逐级脱水,二甲苯透明剂2次,中性树胶封片。光学显微镜下观察海马CA1区神经元形态。

2.6 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测脑中5-HT及血浆中ACTH,CORT表达水平 选用眼球取血法采集小鼠血液样本,于冰上快速分离出脑组织,液氮储存,4℃条件下,5 000 r·min⁻¹离心30 min后分离出血浆样本。严格按照ELISA试剂盒说明书操作,测定小鼠脑组织中5-HT含量以及血浆中ACTH,CORT水平。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠脑组织中AC/cAMP/PKA信号通路相关蛋白表达 精密称定小鼠脑组织质量,置于研磨器中,按比例加入蛋白裂解液,超声破碎,于4℃,12 000 r·min⁻¹离心20 min(离心半径8.5 cm)取上清。提取蛋白步骤操作完毕后,以 β -actin为内参进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜90 min,5%脱脂奶粉封闭90 min,加入一抗ADCY6(1:1 000),PKA(1:1 000),CREB-1(1:1 000),BDNF(1:1 000), β -actin(1:15 000)4℃孵育过夜,次日用Tris缓冲盐溶液洗膜4次,加入二抗(HRP标记大鼠IgG,1:8 000),于37℃孵育1 h。ECL显影,曝光照相及图像分析。利用Tanon Gis软件分析条带灰度值,用目的蛋白与 β -actin灰度比值反映蛋白的相对表达量。

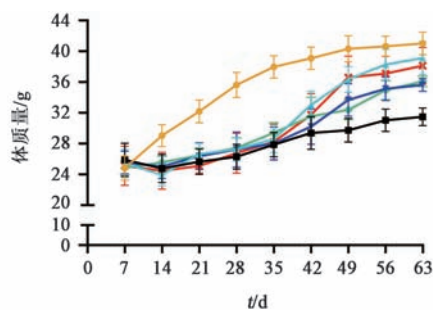
2.8 统计学分析 利用SPSS 20.0软件对实验结果进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠一般生长状态的影响 造模前,各组小

鼠精神状态良好,皮毛顺滑有光泽,粪便形态正常,且寻觅探索的行为较多;造模第1周结束,与造模前比较,各组小鼠精神状态和皮毛无明显差异,但饮水量均有所下降。造模第2~4周逐步发生变化,小鼠毛色黯淡且杂乱,出现了食欲减退、溏便的症状,精神状态较差,极少出现舐毛、攀爬等动作,自主活动行为较少,常处于蜷缩静止状态;给药第1周,与模型组小鼠比较,给药组小鼠饮水量有所上升,溏便症状有所改善。给药第4周,各组小鼠差异明显,与空白组小鼠比较,模型组小鼠毛色发黄,枯槁无光,反应迟缓,眼角有深棕色分泌物,精神状态不佳。与模型组比较,盐酸氟西汀组,LLP组,APS组及LLP+APS组小鼠萎靡状态均有明显改善,攀爬、直立等自主活动增多,无溏便现象。其中LLP+APS组小鼠精神状态优于LLP组和APS组。

3.2 对抑郁小鼠体质量的影响 与空白组小鼠比较,模型组小鼠体质量增长缓慢且变化幅度显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠体质量变化可分为给药前和给药后2个阶段,给药前与模型组比较无明显变化。给药后,小鼠体质量及增长速率均显著上升($P < 0.01$);与LLP组和APS组比较,LLP+APS组小鼠的体质量及增长速率均显著增加($P < 0.01$)。见图1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 盐酸氟西汀组; D. LLP组; E. APS组; F. LLP+APS组(图2~4同)

图1 LLP, APS及LLP+APS对小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Effect of LLP, APS and LLP+APS on body weight of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.3 行为学指标观察结果

3.3.1 对抑郁小鼠自主活动的影响 与空白组比较,模型组小鼠运动总距离和中央区运动距离所占百分比显著降低($P < 0.01$),且运动轨迹单一;与模型组比较,盐酸氟西汀组,LLP组,APS组及LLP+APS组小鼠的水平运动距离和中央区所占比值均显著增加($P < 0.01$);与LLP组和APS组比较,LLP+APS组小鼠穿梭旷场中央区域的轨迹频繁,中央区

运动距离所占百分比均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$)。见图2,表1。

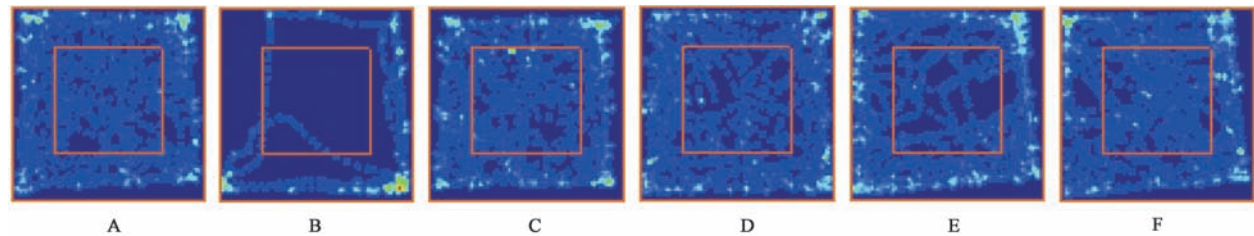


图2 LLP,APS及LLP+APS对小鼠自主活动的影响
Fig. 2 Effect of LLP, APS and LLP+APS on autonomic activity in mice

表1 LLP,APS及LLP+APS对小鼠运动总距离和中央区运动距离所占百分比的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 1 Effect of LLP, APS and LLP+APS on total distance and percentage of central distance in mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	运动总距离 /mm	中央区运动距离 所占百分比/%
空白		39.36±0.87	27.65±0.80
模型		13.17±5.05 ¹⁾	7.75±0.77 ¹⁾
盐酸氟西汀	8	34.67±2.67 ²⁾	28.61±2.01 ²⁾
LLP	200	34.94±2.03 ²⁾	12.96±1.75 ²⁾
APS	200	38.49±1.08 ²⁾	17.63±0.96 ²⁾
LLP+APS	100+100	36.36±1.27 ²⁾	26.21±1.32 ^{2,3,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$;与LLP组比较³⁾ $P<0.05$;与APS组比较⁴⁾ $P<0.01$ 。

3.3.2 对抑郁小鼠绝望程度的影响 在FST和TST中,与空白组比较,模型组小鼠表现更为绝望,累计不动时间显著上升($P<0.01$);与模型组比较,盐酸氟西汀组和LLP+APS组小鼠不动时间均显著缩短($P<0.01$);在FST中,与LLP组比较,LLP+APS组小鼠不动时间显著下降($P<0.01$),与APS组比较有下降趋势,但差异无统计学意义;在TST中,与LLP和APS组比较,LLP+APS组小鼠不动时间均显著下降($P<0.01$)。见表2。

3.3.3 对抑郁小鼠糖水偏爱率的影响 与空白组比较,模型组小鼠的糖水偏爱率显著降低($P<0.01$);与模型组比较,盐酸氟西汀,LLP,APS及LLP+APS组小鼠的糖水偏爱率均显著升高($P<0.01$);与LLP和APS组比较,LLP+APS组小鼠的糖水偏爱率明显上升,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。见表3。

3.4 对抑郁小鼠海马神经元形态的影响 空白组小鼠海马神经元排列紧密整齐,分布均匀,核仁清晰,胞质染色较深,尼式体清晰且含量丰富,无细胞核固缩现象;与空白组比较,模型组小鼠海马神经元排列稀疏散乱,密度降低,核膜边界模糊或消失,

表2 LLP,APS及LLP+APS对小鼠FST和TST不动时间的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 2 Effect of LLP, APS and LLP+APS on immobility time of FST and TST in mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	FST中不动时间	TST中不动时间
空白		102.96±4.47	56.96±3.90
模型		135.69±5.49 ¹⁾	87.14±9.98 ¹⁾
盐酸氟西汀	8	110.50±9.32 ³⁾	64.12±6.50 ³⁾
LLP	200	125.90±4.92 ²⁾	77.08±5.94 ³⁾
APS	200	120.69±5.25 ³⁾	77.78±5.59 ²⁾
LLP+APS	100+100	115.77±5.31 ^{3,4)}	63.51±3.85 ^{3,4,5)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与LLP组比较⁴⁾ $P<0.01$;与APS组比较⁵⁾ $P<0.01$ (表4同)。

表3 LLP,APS及LLP+APS对小鼠糖水偏爱率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 3 Effect of LLP, APS and LLP+APS on sucrose water preference in mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	糖水偏爱率/%
空白		79.44±3.84
模型		43.44±2.60 ¹⁾
盐酸氟西汀	8	67.89±5.90 ²⁾
LLP	200	50.89±2.37 ²⁾
APS	200	56.44±4.80 ²⁾
LLP+APS	100+100	63.11±4.40 ^{2,3,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$;与LLP组比较³⁾ $P<0.01$;与APS组比较⁴⁾ $P<0.05$ 。

胞质着色较浅且所含尼式小体明显减少,部分细胞外出现水肿,并伴有核碎裂、核固缩和核溶解的现象,表明神经元受损;盐酸氟西汀,LLP,APS及LLP+APS均能显著增加抑郁小鼠海马CA1区神经元的密度并恢复其形态,减小细胞间隙,使其排列规范,改善细胞外水肿现象,增加胞质中尼式体数量,能够有效修复受损神经元,其中盐酸氟西汀和LLP+APS组的效果最佳。见图3。

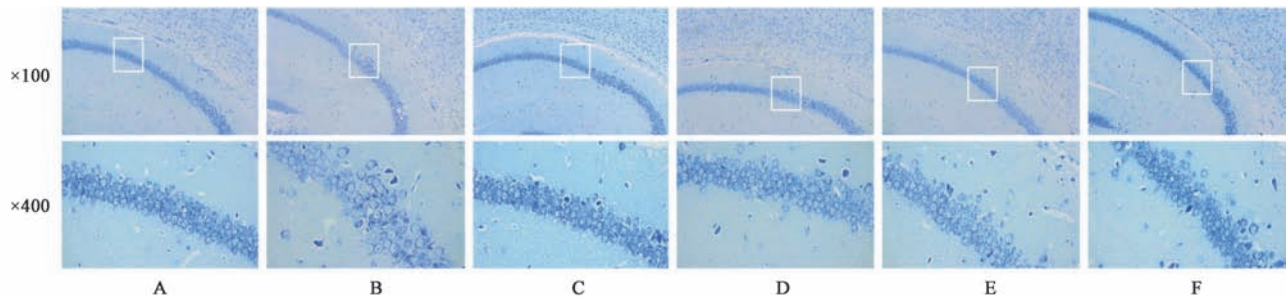


图3 LLP,APS及LLP+APS对小鼠海马CA1区病理学的影响(尼氏染色)

Fig. 3 Effect of LLP, APS and LLP+APS on pathology of hippocampal CA1 region in mice (Nissl)

3.5 对抑郁小鼠脑组织中5-HT水平和血浆中ACTH和CORT含量的影响 与空白组比较,模型组小鼠脑组织中5-HT含量显著降低($P<0.01$),血浆中ACTH和CORT水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,盐酸氟西汀组,APS组和LLP+APS小鼠

的5-HT含量均显著增加($P<0.01$),ACTH和CORT水平显著下降($P<0.01$);与LLP,APS组比较,LLP+APS组小鼠的5-HT含量均显著升高($P<0.01$),ACTH和CORT水平有降低趋势,但差异无统计学意义。见表4。

表4 LLP,APS及LLP+APS对小鼠脑内5-HT及血浆中ACTH和CORT表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 4 Effect of LLP, APS and LLP+APS on expression of 5-HT in brain and ACTH and CORT in plasma of mice ($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	5-HT/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	ACTH/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	CORT/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
空白		49.65±2.00	10.99±3.18	12.00±3.21
模型		25.70±2.03 ¹⁾	32.28±1.45 ¹⁾	29.15±1.12 ¹⁾
盐酸氟西汀	8	40.52±3.47 ³⁾	14.76±5.55 ³⁾	12.15±1.52 ³⁾
LLP	200	36.10±2.64 ³⁾	24.56±2.60 ²⁾	18.30±2.31 ³⁾
APS	200	32.07±2.24 ³⁾	20.88±3.69 ³⁾	19.74±1.11 ³⁾
LLP+APS	100+100	41.95±1.53 ^{3,4,5)}	17.25±7.26 ³⁾	16.87±1.22 ³⁾

3.6 对抑郁小鼠脑组织中ADCY6,PKA,CREB, BDNF蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠脑组织中ADCY6,PKA,CREB-1, BDNF的蛋白表达水平均有显著下降($P<0.01$);与模型组比较,盐酸氟西汀组和LLP+APS组各指标均显著上调($P<0.01$);与单一多糖组比较,LLP+APS组小鼠的ADCY6,CREB-1和BDNF蛋白表达显著上调($P<0.01$)。见表5,图4。

4 讨论

在对天然产物逐步探索的过程中,多糖凭借着独特的结构和良好的生物活性而受到了各研究人员的广泛关注。多糖作为一种生物大分子参与着多种生理过程,具有抗肿瘤、降血糖、调节免疫等药理作用^[20]。研究发现百合水煎液可以有效改善大鼠的抑郁样行为,水煎液中主要包含皂苷和多糖两种成分,而目前对百合抗抑郁有效部位的研究多集

表5 LLP,APS及LLP+APS对小鼠脑组织中ADCY6,PKA,CREB和BDNF蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of LLP, APS and LLP+APS on expression levels of adcy, PKA, CREB and BDNF proteins in mouse brain ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	ADCY6/ β -actin	PKA/ β -actin	CREB-1/ β -actin	BDNF/ β -actin
空白		1.59±0.06	1.43±0.04	1.91±0.14	1.57±0.03
模型		0.53±0.04 ¹⁾	0.70±0.03 ¹⁾	0.78±0.13 ¹⁾	0.87±0.11 ¹⁾
盐酸氟西汀	8	1.14±0.13 ³⁾	1.16±0.14 ³⁾	1.73±0.10 ³⁾	1.28±0.07 ³⁾
LLP	200	0.74±0.05 ²⁾	0.95±0.09 ²⁾	1.13±0.09 ²⁾	1.10±0.03 ³⁾
APS	200	0.72±0.10	0.78±0.06	1.27±0.08 ³⁾	1.06±0.08 ²⁾
LLP+APS	100+100	1.11±0.02 ^{3,4,6)}	1.03±0.07 ^{3,5)}	1.65±0.06 ^{3,4,6)}	1.40±0.04 ^{3,4,6)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与LLP比较⁴⁾ $P<0.01$;与APS比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ 。

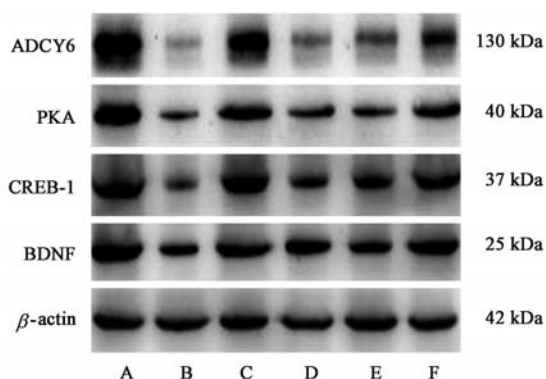


图4 各组小鼠脑组织中ADCY6,PKA,CREB-1,BDNF蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of ADCY6, PKA, CREB-1 and BDNF protein expression in brain tissue of each groups mice

中于皂苷,关于LLP抗抑郁作用的相关报道较少^[21-23]。已有研究证实APS可通过降低大鼠体内炎症因子水平、调控核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路等途径减轻海马神经元的损伤,并对抑郁有一定的治疗作用^[14,24]。由于多糖具有独特的长链结构,因此当溶液中存在2种或者几种不同多糖的大分子长链时,在氢键的作用下,会导致不同多糖链之间产生相容性,从而引起构象的改变,进而影响其药理作用。并且联合后的多糖不仅可以保留单一多糖原有的生物活性,还能相互弥补其自身的局限性,使其可以从不同的途径协同作用。基于此思路本研究以LLP和APS为原材料,将二者按一定比例物理性混合后得到LLP+APS,把LLP和APS与LLP+APS对小鼠抑郁样行为的影响进行对比,探究其是否具有协同作用。

本研究选用CUMS复刻抑郁模型,该方法是将动物长期置于未知的温和应激环境中,引起其绝望无助、快感消失等情绪,诱导抑郁症的发生。此方法能较好地模拟社会上多变的外源性刺激和人类面对压力时的应激情绪,与人类的患病方式最为相近。本研究所采用的旷场实验、糖水偏爱实验、强迫游泳实验和悬尾实验能够分别反应出小鼠自主探索欲望、体验快感的能力及抑郁绝望情绪,以此评判小鼠抑郁程度,结果显示,与空白组小鼠比较,模型组小鼠运动轨迹单一且运动总距离显著降低,对糖水喜爱度下降,强迫游泳和悬尾实验中不动时间显著延长,表明模型建立成功。经LLP,APS干预后,各指标均有所改善,表明2种多糖皆可不同程度地减轻CUMS引起的小鼠抑郁行为,具有抗抑郁作用,并且二者联用后,在同等给药剂量下,LLP+APS的抗抑郁效果显著优于单一多糖,表明LLP与APS

联用可达到协同增效的目的。本课题所用均为杂多糖,由甘露糖、葡萄糖等多种单糖组成,课题组前期研究表明,经DEAE-52纤维素柱色谱分离,以蒸馏水为洗脱剂得到的百合多糖主要由甘露糖、葡萄糖醛酸,N-乙酰氨基葡萄糖、葡萄糖、半乳糖和岩藻糖组成,质量比为1:0.19:0.32:0.46:0.57:0.25;黄芪多糖由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖和半乳糖组成,质量比为29.12:1.89:4.00:1.35:1:81.97^[13]。二者联用后,除了单糖种类更加丰富,甘露糖、葡萄糖和半乳糖的含量也大大增加,其中甘露糖参与着机体免疫应答的过程,可以抑制由应激分泌的炎症因子对下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴和神经元细胞的损伤,同时甘露糖和葡萄糖均可以被神经元细胞直接摄取,为其提供能量,抑制神经元细胞凋亡,进而发挥抗抑郁的作用^[25-26],因此联用多糖抗抑郁效果优于单一多糖可能与增加甘露糖的含量密切相关。

抑郁症的发病机制复杂,尚未完全阐明,但增加脑内神经递质含量、抑制HPA轴持续应激已被证实是治疗抑郁症的有效途径^[27-29]。5-HT作为脑内重要的神经递质,与疼痛、睡眠、记忆调控等活动密切相关,研究表明与正常人比较,抑郁患者体内的5-HT含量会显著性降低,且HPA轴负反馈调节失衡,其最直接的表现血浆内CORT和ACTH水平持续升高,而高水平的CORT则导致海马中糖皮质激素受体和盐皮质激素受体被过度激活,使得海马受损,无法完成对HPA轴的负反馈调节,进入恶性循环,同时还影响了中缝核5-HT神经元活性,引起5-HT传导功能受损^[30-33],进而在一定程度上影响了5-HT所介导的AC/cAMP/PKA信号转导通路。近年来关于抑郁症发病机制中信号转导通路这一假说也逐步被研究者们所认可,5-HT和ACTH均可作用于G蛋白偶联受体,从而激活AC催化ATP水解形成cAMP,进一步活化PKA,PKA磷酸化后,促进CREB结合启动基因转录,调节下游BDNF蛋白合成,进而发挥抑制神经元凋亡并促进其修复的作用^[34]。本实验结果显示,造模后,抑郁组小鼠脑内5-HT含量显著降低,CORT和ACTH水平显著上升,ADCY,PKA,CREB及BDNF蛋白表达水平显著下降,表明模型制备成功,与行为学结果相符,经LLP+APS干预后,5-HT含量显著升高,CORT和ACTH水平显著下降,各蛋白表达水平也显著上升,但与LLP组和APS组比较,差异无统计学意义,分析其原因可能是由于中药本身具有多途径、多靶点

的作用,而行为学差异显著是多种途径共同作用的宏观表现,并且根据多糖特殊的结构属性,当其进入体内后会被肠道内的微生物所分解,生成短链脂肪酸,该产物可与肠道免疫细胞相互作用,通过游离脂肪酸受体调节炎症因子的水平,影响神经炎症,因此LLP+APS也可通过免疫途径间接影响情绪、记忆等功能,减轻神经元损伤,使得小鼠抑郁样行为得到明显改善。

综上所述,本研究结果表明,LLP和APS能够不同程度的改善小鼠抑郁样行为,具有抗抑郁作用,且联用后抗抑郁效果显著增强,其作用机制可能与升高脑内5-HT水平、抑制HPA轴持续应激、进而激活AC/cAMP/PKA信号转导通路,上调BDNF水平有关。本研究阐述了LLP与APS联用后可能的抗抑郁机制,但关于二者最佳配伍比例和更精准的作用靶点还有待日后进一步的研究。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 赵洪庆,唐林,吴碧茹,等. 百合地黄汤抑制NLRP3炎症小体激活改善焦虑性抑郁症模型大鼠海马神经元损伤[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20): 7-14.
- [2] JESULOL E, MICALOS P, BAGULEY I J. Understanding the pathophysiology of depression: from monoamines to the neurogenesis hypothesis model-are we there yet?[J]. Behav Brain Res, 2018, 341:79-90.
- [3] MALHI G S, MANN J J. Depression [J]. Lancet, 2018, 392(10161):2299-2312.
- [4] 于贺,何忠梅,时坤,等. 黄藤总生物碱抗抑郁作用研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14):3678-3686.
- [5] ROTHMORE J. Antidepressant-induced sexual dysfunction[J]. Med J Aust, 2020, 212(7):329-334.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020:137.
- [7] 栗倩,吴萍,夏伯候,等. 百合化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(11):875-882.
- [8] MA K, WANG X, FENG S, et al. From the perspective of traditional Chinese medicine: treatment of mental disorders in COVID-19 survivors [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 132:110810.
- [9] 马柯,张洪秀,董振飞,等. 百合地黄汤治疗抑郁症的研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(4):874-878.
- [10] 赵洪庆,刘检,孟盼,等. 百合地黄汤对焦虑性抑郁症模型大鼠海马突触可塑性的影响[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5):1205-1210.
- [11] ZHOU J, AN R, HUANG X. Genus liliun: a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270:113852-113869.
- [12] 赵芷萌,赵宏,王宇亮,等. 百合多糖的纯化及其对肠道菌群失调小鼠的调节作用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(8):295-300, 306.
- [13] 唐雨薇,张宇,王宇亮,等. 黄芪多糖分离与结构特征分析[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(5):1097-1100.
- [14] 李承德. 黄芪多糖的抗抑郁作用及其机制的实验研究[D]. 济南:山东中医药大学, 2018:61-65.
- [15] HAO Y, GE H, SUN M, et al. Selecting an appropriate animal model of depression. [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19):4827.
- [16] SUN G G, SHIH J H, CHIOU S H, et al. Chinese herbal medicines promote hippocampal neuroproliferation, reduce stress hormone levels, inhibit apoptosis, and improve behavior in chronically stressed mice [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 193:159-168.
- [17] WILLNER P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation [J]. Psychopharmacology (Berl), 1997, 134(4):319-329.
- [18] 吕小荣. 盐酸氟西汀胶囊加用中药汤剂治疗抑郁症的临床疗效分析[J]. 中国初级卫生保健, 2016, 30(8):82-83.
- [19] WANG W K, ZHOU Y, FAN L, et al. The antidepressant-like effects of Danggui Buxue Decoction in GK rats by activating CREB/BDNF/TrkB signaling pathway [J]. Phytomedicine, 2021, 89:153600.
- [20] YU Y, SHEN M, SONG Q, et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review [J]. Carbohydr Polym, 2018, 183:91-101.
- [21] 尹玲珑,彭察安,张宜,等. 道地药材湘西龙山百合对慢性应激抑郁模型小鼠脑内5-HT表达影响的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(2):357-358.
- [22] 黄江剑. 百合抗抑郁有效部位质量标准及药理作用研究[D]. 广东:广州中医药大学, 2011, 37-52.
- [23] 王英军,孙英莲. 赤芍总苷与百合总皂苷联合应用抗抑郁作用研究[J]. 特产研究, 2020, 42(5):30-33.
- [24] SONG M T, RUAN J, ZHANG R Y, et al. Astragaloside IV ameliorates neuroinflammation-induced depressive-like behaviors in mice via the PPAR γ /NF- κ B/NLRP3 inflammasome axis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(10):1559-1570.
- [25] RASTEDT W, BLUMRICH E M, DRINGEN R.

- Metabolism of mannose in cultured primary rat neurons [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(8): 2282-2293.
- [26] ZHANG W, CHENG H, GUI Y et al. Mannose treatment: a promising novel strategy to suppress inflammation[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 756920.
- [27] CHEN P, HEI M, KONG L, et al. One water-soluble polysaccharide from *Ginkgo biloba* leaves with antidepressant activities via modulation of the gut microbiome [J]. *Food Funct*, 2019, 10 (12) : 8161-8171.
- [28] PARIANTE C M, LIGHTMAN S L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments [J]. *Trends Neurosci*, 2008, 31 (9) : 464-468.
- [29] ZHANG Y, LI L, ZHANG J. Curcumin in antidepressant treatments: an overview of potential mechanisms, pre-clinical/clinical trials and ongoing challenges [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2020, 127(4): 243-253.
- [30] ŚLIFIRSKI G, KRÓL M, TURŁO J. 5-HT receptors and the development of new antidepressants [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 9015.
- [31] YOHN C N, GERGUES M M, SAMUELS B A. The role of 5-HT receptors in depression [J]. *Mol Brain*, 2017, 10(1): 28.
- [32] MAHAR I, BAMBICO F R, MECHAWAR N, et al. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2014, 38: 173-192.
- [33] 王玉露, 芦锰, 王月月, 等. 蒲郁胶囊对抑郁小鼠行为学、HPA轴及海马CREB-BDNF通路表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(20): 4971-4977.
- [34] 王金梦, 杨玉, 刘星玥, 等. 基于信号通路的中药抗抑郁症作用机制研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(1): 115-118.
- [责任编辑 孙丛丛]

• 书讯 •

射频热凝靶点消融术治疗腰椎间盘突出症的应用 ——《颈腰椎关节病的治疗与调养》

腰腿痛是临床上较为常见的病症,大部分疼痛症状是由椎间盘突出引起的。腰椎间盘突出症是临床多发病,发病原因是因腰椎间盘的退行性变化、外伤和劳损等诱发。作为椎间盘主要支架的纤维环变得薄弱、甚至破裂,腰椎间盘向后的椎管内突出或破裂脱出,导致相邻的组织,如脊神经根、脊髓等遭受刺激或压迫,椎间盘变性、纤维环破裂、髓核突出刺激或压迫神经根、马尾神经所表现的一种综合征,从而产生腰部疼痛、单侧或双侧下肢麻木疼痛等临床症状,严重影响患者的社会工作和家庭生活。

《颈腰椎关节病的治疗与调养》由李易男主编,上海科学技术文献出版社2018年出版。分别对18种常见病症,从治疗和调养两个方面介绍了诊治方法、治疗方案和调养方式。重点介绍颈腰椎关节病的治疗与调养,对颈腰椎关节病的发病原因、症状表现、疾病防治等做了简要的说明。我院自2006年8月开始,采用射频热凝靶点消融术治疗腰椎间盘突出症患者,疗效满意。本病传统的治疗方法较多,通常采用推拿、牵引、腰椎间盘内注射皮质类固醇激素、腰椎间盘内电热疗法等,但效果均不满意。如牵引治疗后容易复发,椎间盘内注射皮质类固醇激素其远期疗效不太明显,激光治疗容易造成热损伤;手术是治疗腰椎间盘突出症的有效方法,但患者往往因恐惧而不愿接受;可以通过微创手术射频消融去除压迫腰椎间盘突出神经组织,用于治疗腰椎间盘源性的疼痛。他是利用射频电极在腰椎间盘内形成射频电场,射频电流是一种频率100 kHz-3 MHz的高频交流电。射频消融术治疗腰椎间盘突出症即通过消融电极在椎间盘中将射频能量通过棒尖端的裸露部分发射,从而汽化部分腰椎间盘髓核组织。该技术既确保使胶原蛋白分子螺旋结构收缩,又能保持髓核细胞的活力,使椎间盘髓核体积缩小,达到消除和缓解临床症状。书中记载,此方法主要以临床症状的改善情况为判断标准。并把各种术后反应按级划分,优为大部分症状消失,颈腰部活动正常,行走自如,椎间孔挤压试验、直腿抬高试验阴性,疼痛程度按VAS评分法为≤1分,恢复原工作和学习。良为症状明显减轻,颈腰部活动基本正常,可参加日常工作和生活,但劳累后症状加重,休息后症状减轻,疼痛程度按VAS评分法较术前下降60%~90%,恢复原工作和学习。差为症状较前稍有减轻,颈腰部活动范围较前略加大,腰椎间孔挤压试验或直腿抬高试验较前有改善,疼痛程度按VAS评分法较术前下降30%~50%,不能正常生活和工作。无效为症状、体征较前无变化。射频热凝靶点消融术也并非完美无缺的一项技术,其操作的技术要求较高,术前应有充分的准备,仔细阅读影像学资料,必须注意靶点和穿刺点准确选择,治疗过程中严格各种测试,避免神经损伤。对于颈腰椎间盘突出物钙化的患者,务必注意钙化的位置和大小,若钙化的位置与靶点的位置太近或过大,则不符合治疗的适应证;椎管狭窄的患者、明显的骨质增生、黄韧带及后纵韧带肥厚和钙化者则不宜施行手术。总体来说,与其他的微创手术比较,射频热凝靶点消融术是治疗腰椎间盘突出症的有效方法。对该技术的疗效评估无论是从患者治疗前后的体征变化还是影像学的对照资料,已得到越来越多的证实,值得推广应用。

《颈腰椎关节病的治疗与调养》一书详细介绍了颈椎骨腰椎间盘突出症的预防与调养方式,读者不仅能够掌握防治知识,还能了解颈腰椎关节病的饮食、运动和保健之道,针对治疗颈腰椎间盘突出症是有非常大的帮助。

(作者苏志勇,翟阳,石伟素,石家庄市栾城人民医院,石家庄 051430)