

雪菊抗抑郁有效部位的筛选及其作用机制研究[△]

马瑞*,李爽,王祯,高娟娟,谢艾迪,韩海霞[#](新疆农业大学食品科学与药学学院,乌鲁木齐 830052)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)10-1177-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.10.05



摘要 目的 筛选雪菊的抗抑郁有效部位,并对其作用机制进行研究。方法 采用悬尾实验和强迫游泳实验考察雪菊75%乙醇提取物的30%、50%、70%、90%乙醇洗脱部位(CCTE)的抗抑郁作用。采用小鼠甩头实验、利血平拮抗实验、育亨宾毒性增强实验和体外单胺氧化酶(MAO)抑制实验,探究有效部位与5-羟色胺(5-HT)及去甲肾上腺素(NE)能神经相关的作用机制。结果 雪菊75%乙醇提取物的50%、70% CCTE能显著缩短小鼠悬尾实验和强迫游泳实验的累计静止不动时间($P<0.05$ 或 $P<0.01$),增加小鼠的甩头次数($P<0.01$),显著逆转利血平引起的眼睑下垂、肛温下降和运动不能($P<0.05$ 或 $P<0.01$),增加育亨宾毒性导致的小鼠死亡只数($P<0.01$);雪菊中奥卡宁(CCT-6)、异奥卡宁(CCT-7)、花旗松素(CCT-8)对MAO的半数抑制浓度(IC_{50})分别为8.71、37.89、67.07 $\mu\text{mol/L}$ 。结论 雪菊75%乙醇提取物的50%、70% CCTE是雪菊抗抑郁的有效部位,其抗抑郁作用可能与增加5-HT浓度及活化NE能神经有关。CCT-6、CCT-7和CCT-8抑制MAO可能是雪菊抗抑郁的作用机制之一。

关键词 雪菊;抗抑郁;有效部位;单胺类神经递质;5-羟色胺;去甲肾上腺素能神经

Screening of effective anti-depressant part from *Coreopsis tinctoria* and study on its mechanism

MA Rui, LI Shuang, WANG Zhen, GAO Juanjuan, XIE Aidi, HAN Haixia (College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 800052, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To screen the effective anti-depressant part from *Coreopsis tinctoria* and study its mechanism. **METHODS** The anti-depressant effects of 30%, 50%, 70% and 90% ethanol elution fractions from 75% ethanol extract of *C. tinctoria* (CCTE) were investigated by tail suspension test and forced swimming test. Mice head-drop test, reserpine antagonistic test, yohimbine toxicity enhancement test and *in vitro* monoamine oxidase (MAO) inhibition test were used to explore the mechanism of the relationship between the effective parts and 5-hydroxytryptamine (5-HT) and norepinephrine (NE) nerves. **RESULTS** The 50% and 70% CCTE could significantly shorten the accumulative immobility time in tail suspension test and forced swimming test ($P<0.05$ or $P<0.01$), increase the number of head-shaking times ($P<0.01$), reverse the eyelid ptosis, hypothermia and immobility caused by hematoxin ($P<0.05$ or $P<0.01$), and increase the number of dead mice caused by yohimbine toxicity ($P<0.01$). IC_{50} of okanin (CCT-6), isookanin (CCT-7) and taxifolin (CCT-8) against MAO were 8.71, 37.89 and 67.07 $\mu\text{mol/L}$, respectively. **CONCLUSIONS** The 50% and 70% CCTE are the effective anti-depressant parts of *C. tinctoria*. Its anti-depressant effect may be related to the reinforcement of 5-HT and the activation of NE nerves. The inhibition of CCT-6, CCT-7 and CCT-8 against MAO may be one of the anti-depressant mechanism of *C. tinctoria*.

KEYWORDS *Coreopsis tinctoria*; anti-depressant; effective part; monoamine neurotransmitter; 5-hydroxytryptamine; norepinephrine nerve

抑郁症是以情感及精神状态低下为主要症状的一类病症之统称,可伴随着不同程度的意识与行动状态改变,其发病机制复杂^[1]。临床常用的抗抑郁药虽然有一定疗效,但副作用明显。近些年,我国抑郁症发病率呈上升趋势,且防治效果仍待提高^[2]。大量文献表明,天然来源的抗抑郁活性成分具有疗效好、不良反应少及耐受性好等优点^[3-5],因此可从天然植物中寻找具有抗抑郁作用的活性物质,以弥补现有抗抑郁药的不足。

雪菊,又名两色金鸡菊,为菊科金鸡菊属多年生草本植物两色金鸡菊 *Coreopsis tinctoria* Nutt. 的干燥头状花序^[6-7],其原植物分布于北美、印度、中国等地。在中国,两色金鸡菊主要以新疆的和田、喀什、阿克苏等地为主产区,塔城、达坂城、昌吉等地也有种植。研究表明,雪菊中含有黄酮类、生物碱类、有机酸类及多糖类等活性物质^[8];雪菊提取物的主要药理活性有降血脂、降血压、降血糖、抗凝血、抗氧化、抗炎等^[9]。近年来有研究表明,天然植物所含的黄酮类或多酚类化合物具有良好的抗抑郁作用^[10]。雪菊中,黄酮类和多酚类成分种类丰富,其总黄酮含量为15.81%,总多酚含量为10.04%^[11]。本文作者前期通过行为绝望抑郁模型发现,雪菊75%乙

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81760777)

* 硕士研究生。研究方向:食品营养与安全。E-mail:1453473964@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:食品药品安全性评价、体内药物代谢与转运。E-mail:7939524@qq.com

醇提取物具有抗抑郁作用,因此本研究拟采用小鼠悬尾实验和强迫游泳实验来考察雪菊75%乙醇提取物的30%、50%、70%、90%乙醇洗脱部位(ethanol elution from the *C. tinctoria* Nutt. extract, CCTE)的抗抑郁作用,筛选雪菊抗抑郁活性的有效部位。

经典的“单胺类神经递质假说”认为,脑中5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)等单胺类神经递质浓度下降是导致抑郁症发生的直接原因^[12]。因此,本文将采用5-羟色氨酸(5-hydroxytryptophane, 5-HTP)诱导的小鼠甩头实验、利血平拮抗实验和育亨宾毒性增强实验探究雪菊抗抑郁有效部位的作用是否与单胺类神经系统功能相关。研究还发现,神经元突触间隙中的5-HT、NE易被单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)降解失活,从而诱发抑郁症^[13]。Ma等^[14]在雪菊提取物中分离鉴定出11个多酚类物质(编号CCT-1~CCT-11),包括马里苷(CCT-1)、异奥卡宁-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(CCT-2)、花旗松素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(CCT-3)、栎草亭-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(CCT-4)、5,7,3',5'-四羟基二氢黄酮-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(CCT-5)、奥卡宁(CCT-6)、异奥卡宁(CCT-7)、花旗松素(CCT-8)、绿原酸(CCT-9)、3,5-二咖啡酰奎宁酸(CCT-10)和4,5-二咖啡酰奎宁酸(CCT-11)。为了进一步探究雪菊抗抑郁作用是否与抑制MAO从而保护5-HT、NE等单胺类神经递质不被降解有关,本研究拟采用体外酶抑制实验考察上述11个多酚类物质对MAO的抑制作用,以期为雪菊抗抑郁作用机制和药效物质基础的进一步阐明提供数据参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括LC20AB型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司),TG16-W型高速台式冷冻离心机(四川蜀科仪器有限公司),Alphal-LDplus型冷冻干燥机(北京五洲东方科技发展有限公司),ZWY-200D型恒温培养振荡器(上海智诚分析仪器制造有限公司),RE-500型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),xMark™型酶标仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司],EL202型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],KQ-250DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),MTV-100型多管漩涡混合仪(杭州奥盛仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

雪菊药材购于新疆乌鲁木齐市北园春批发市场,产自和田墨玉县,由新疆博州食品药品检验所吴继周副研究员鉴定为菊科金鸡菊属多年生草本植物两色金鸡菊*C. tinctoria* Nutt.的干燥头状花序。盐酸利血平(批号

E1814115)、帕吉林(批号L1518016)、5-HTP(批号H1815003)、盐酸育亨宾(批号D18405)、盐酸氟西汀(批号C101874)、盐酸丙咪嗪(批号171101)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度均大于99%;肝素钠注射液(批号510108,规格2 mL:12 500单位)由新疆医科大学第一附属医院提供,生产厂家为上海上药第一生化药业有限公司;AB-8型大孔吸附树脂(粒度0.3~1.25 mm,批号HG2-885-76)购自天津市光复精细化工研究所;蔗糖(批号20201009)、磷酸氢二钠(批号20201009)、磷酸二氢钠(批号20160706)均购自天津市鑫铂特化工有限公司;甲醇(批号20201008)、乙腈(批号20210329)均购自福晨(天津)化学试剂有限公司。

1.3 实验动物

清洁级雄性ICR小鼠,体质量为(20±2)g,购于新疆医科大学动物实验中心,动物生产许可证号为SCXK-(新)2021-0015。

2 方法

2.1 雪菊抗抑郁有效部位的筛选

2.1.1 雪菊75%乙醇提取物及各CCTE的制备 取干燥的雪菊药材,50℃下干燥2h,粉碎,按20倍量(mL/g)加入75%乙醇,在(25±2)℃下浸泡2h后,超声(功率250W,频率40kHz,下同)提取40min;纱布过滤,滤渣以雪菊原药材的15倍量(mL/g)加入75%乙醇超声提取,重复提取2次;纱布过滤,合并3次滤液,浓缩,干燥,即得雪菊75%乙醇提取物,得率为34.60%(以生药量计)。将雪菊75%乙醇提取物上样至AB-8型大孔吸附树脂,用30%、50%、70%、90%乙醇依次洗脱,即得不同体积分数的乙醇洗脱液;将各乙醇洗脱液浓缩,冷冻干燥,即得雪菊75%乙醇提取物的30%、50%、70%、90% CCTE,得率分别为16.40%、5.75%、0.80%、0.28%(以生药量计)。

2.1.2 动物分组及给药 根据雪菊的不同用途,成人每日用量以雪菊药材计为每50kg体质量2~20g。本实验将成人每日最高用量与小鼠剂量进行换算,再经“2.1.1”项下得率换算后将小鼠30% CCTE和50% CCTE低、中、高剂量确定为0.25、0.50、1.00 g/kg(以生药量计);考虑到70% CCTE和90% CCTE极性弱于30% CCTE和50% CCTE,可能会更容易透过血脑屏障而发挥中枢神经药理作用^[15],故将70% CCTE和90% CCTE低、中、高剂量在30% CCTE和50% CCTE剂量上依次递减一半,确定为0.125、0.25、0.50 g/kg(以生药量计)。4个洗脱部位在各自设定的给药剂量下进行抗抑郁作用有效部位的筛选。阳性药盐酸氟西汀临床服用剂量为20~60 mg/d,本实验将成人每日用量与小鼠剂量进行换算,

得小鼠每日盐酸氟西汀灌胃量为0.02 g/kg。

取140只小鼠,随机分为14组,每组10只,分别为空白对照组、30% CCTE组(0.25、0.50、1.00 g/kg)、50% CCTE组(0.25、0.50、1.00 g/kg)、70% CCTE组(0.125、0.25、0.50 g/kg)、90% CCTE组(0.125、0.25、0.50 g/kg)、盐酸氟西汀组(0.02 g/kg)。空白对照组给予0.50%羧甲基纤维素钠溶液,其余各组分别给予相应药物,连续给药7 d,每天给药1次。末次给药30 min后,考察小鼠悬尾实验和强迫游泳实验中的静止不动时间。

2.1.3 悬尾实验 参考文献[16],将各组小鼠固定于25 cm×25 cm×35 cm、内壁四周为黑色的箱子中,且小鼠头部与箱子底面保持5 cm的距离,检测时长共6 min,记录后5 min内小鼠的累计静止不动时间。以小鼠暂停挣扎,全身呈垂直倒悬的静止状态为静止不动的判定标准。

2.1.4 强迫游泳实验 参考文献[16],将各组小鼠放置于高度25 cm、直径10 cm、水深15 cm、水温(23±2)℃的透明玻璃水缸中,检测时长共6 min,记录后5 min内小鼠的累计静止不动时间。以小鼠在水面暂停挣扎,出现漂浮的平衡状态为静止不动的判定标准。

2.2 5-HTP诱导的小鼠甩头实验

参考文献[16],将80只小鼠随机分为8组(组别设置参考“2.1”项下结果):空白对照组、盐酸氟西汀组(0.02 g/kg)、50% CCTE组(0.25、0.50、1.00 g/kg)、70% CCTE组(0.25、0.50、1.00 g/kg),每组10只。各组小鼠每天给药1次,连续14 d。各组小鼠在末次给药前45 min按75 mg/kg腹腔注射帕吉林(生理盐水溶解);末次给药后45 min,按10 mg/kg腹腔注射5-HTP(生理盐水溶解),15 min后观察其甩头次数。检测时长共6 min,记录后5 min内每只小鼠的甩头总次数。以小鼠快速摇头而躯体未随之转动为评价指标。

2.3 小鼠利血平拮抗实验

参考文献[16],将90只小鼠随机分为9组(组别设置参考“2.1”项下结果):空白对照组、模型组、盐酸丙咪嗪组(0.02 g/kg)、50% CCTE组(0.25、0.50、1.00 g/kg)、70% CCTE组(0.25、0.50、1.00 g/kg),每组10只。各组小鼠每天给药1次,连续7 d。各组小鼠在末次给药1 h后按4 mg/kg腹腔注射盐酸利血平(生理盐水溶解),1 h后分别记录其眼睑下垂评分和运动不能情况,4 h后检测小鼠肛温。

2.4 小鼠育亨宾毒性增强实验

参考文献[17],将80只小鼠随机分为8组(组别设置参考“2.1”项下结果):空白对照组、盐酸丙咪嗪组(0.02 g/kg)、50% CCTE组(0.25、0.50、1.00 g/kg)、70% CCTE组(0.25、0.50、1.00 g/kg),每组10只。各组小鼠每天给药1次,连续7 d。各组小鼠在末次给药30 min后按35

mg/kg皮下注射盐酸育亨宾(生理盐水溶解),记录各组小鼠24 h内的死亡情况。

2.5 CCTE中多酚类物质对MAO的活性抑制实验

2.5.1 MAO制备 参考 Youdim 等^[18]的方法并稍作修改:将小鼠处死,迅速于冰上取出小鼠大脑,将脑组织和0.30 mol/L蔗糖溶液按1:35(g/mL)的比例制成匀浆,于4℃条件下离心10 min(1 500 r/min),分离上清液,沉淀备用;将上清液于4℃条件下离心30 min(10 000 r/min),弃去上清液,沉淀备用。将前后2个沉淀分别用0.30 mol/L蔗糖溶液(每克脑组织加0.30 mol/L蔗糖溶液0.80 mL)混悬,合并,再加入1.20 mol/L蔗糖溶液(每克脑组织加1.20 mol/L蔗糖溶液8.00 mL),混匀,于4℃条件下离心40 min(10 500 r/min);弃去上清液,向沉淀中加入pH7.4的50.00 mmol/L磷酸盐缓冲液(每克脑组织加50.00 mmol/L磷酸盐缓冲液0.40 mL),混匀,于4℃条件下离心40 min(10 500 r/min);弃去上清液,向沉淀中加入pH7.4的50.00 mmol/L磷酸盐缓冲液(每克脑组织加50.00 mmol/L磷酸盐缓冲液0.40 mL),混悬,即得MAO溶液,分装后于-80℃储存备用。

2.5.2 酶活性抑制实验 取MAO溶液10 μL(以1.50 mg/mL蛋白浓度计)置于1.5 mL离心管中,再加磷酸盐缓冲液适量(10.00 mmol/L, pH7.0),混匀,于37℃恒温培养箱中预孵育10 min,然后加2 μL 5-HT溶液(2.00 mmol/L,以水溶解)和10 μL受试药物溶液(0.10、1.00、10.00、25.00、50.00、100.00 μmol/L,各受试药物以甲醇溶解,再以50%甲醇稀释至所需浓度),再加磷酸盐缓冲液(10.00 mmol/L, pH7.0)使反应体系终体积为100 μL,于37℃孵育60 min。取MAO溶液,除不加底物5-HT溶液外,其余按上述方法在同样条件下孵育,作为各受试药物的对照。另设1组,除不加MAO溶液外,其余按上述方法在同样条件下孵育,作为加5-HT溶液时各受试药物的对照。另取加热失活(90℃, 30 min)的MAO溶液,按上述方法在同样条件下与5-HT溶液共同孵育作为MAO酶溶液与5-HT溶液完全反应的对照。受试药物有帕吉林(阳性抑制剂)、CCT-1、CCT-2、CCT-3、CCT-4、CCT-5、CCT-6、CCT-7、CCT-8、CCT-9、CCT-10、CCT-11,每组平行3份。

2.5.3 样品处理 取“2.5.2”项下方法所得反应溶液,立即加冰冷的乙腈200 μL终止反应,在多管漩涡混合仪中涡旋5 min后,离心10 min(13 000 r/min),取上清液进样,采用高效液相色谱法测定产物峰面积。

2.5.4 色谱条件 参考文献[19]方法并稍作修改:以Agilent SB-AQ C₁₈(150 mm×4.60 mm, 5 μm)为色谱柱,以水(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~3.00 min, 10%B; 3.00~3.10 min, 10%B→50%B; 3.10~5.00 min,

50%B; 5.00~5.10 min, 50%B→10%B; 5.10~8.00 min, 10%B); 流速为0.70 mL/min; 进样量为10.00 μL; 检测波长为254 nm。

2.5.5 MAO活性抑制率计算 MAO活性抑制率(%)=[(A-A₀)-(A_i-A₀)]/(A-A₀)×100%。式中,A为MAO与5-HT溶液孵育后测得的产物峰面积;A₀为失活MAO与5-HT溶液孵育后测得的产物峰面积;A_i为仅加5-HT溶液时各给药组测得的产物峰面积;A₀为不加5-HT溶液时各给药组测得的产物峰面积。

2.6 数据处理

实验结果数据采用GraphPad Prism 5.0软件进行分析,计数资料(利血平拮抗实验的运动不能动物数和育亨宾毒性实验死亡动物数)采用Fisher精确检验,其余计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 30%、50%、70%、90%CCTE的抗抑郁作用

30%、50%、70%、90%CCTE连续灌胃7 d后,小鼠悬尾实验和强迫游泳实验结果见表1。由表1可知,与空白对照组相比,30%CCTE(0.25、0.50、1.00 g/kg)均不能缩短小鼠悬尾实验和强迫游泳实验的累计静止不动时间,表明30%CCTE不具有抗抑郁活性;50%CCTE(1.00 g/kg)能显著缩短小鼠悬尾实验和强迫游泳实验的累计静止不动时间($P < 0.05$),表明50%CCTE(1.00 g/kg)具有抗抑郁活性;70%CCTE(0.25、0.50 g/kg)与盐酸氟西汀均可显著缩短小鼠悬尾实验和强迫游泳实验的累计静止不动时间($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),表明70%CCTE(0.25、0.50 g/kg)具有抗抑郁活性;90%CCTE(0.25、0.50 g/kg)不能缩短小鼠悬尾实验的累计静止不动时间,但可显著缩短小鼠强迫游泳实验的累计静止不动时间($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。综上所述,50%、70%CCTE可作为雪菊抗抑郁的有效部位来进行下一步筛选。

3.2 5-HTP诱导的小鼠甩头实验结果

与空白对照组相比,50%CCTE(1.00 g/kg)、70%CCTE(0.50、1.00 g/kg)和盐酸氟西汀(0.02 g/kg)组小鼠甩头次数均显著增加($P < 0.01$),表明50%、70%CCTE均能明显增加5-HTP诱导的小鼠甩头次数。结果见表2。

3.3 小鼠利血平拮抗实验结果

与空白对照组相比,模型组小鼠明显表现出眼睑下垂、运动不能及肛温下降等特征性现象($P < 0.01$),表明利血平诱导小鼠抑郁模型复制成功。与模型组相比,50%CCTE(1.00 g/kg)组、70%CCTE(0.50、1.00 g/kg)组及盐酸丙咪嗪(0.02 g/kg)组小鼠上述特征性现象均发生

显著逆转($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),剩余剂量组小鼠上述部分特征性现象也发生显著逆转($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表3。

表1 30%、50%、70%、90%CCTE对小鼠悬尾和强迫游泳实验中累计静止不动时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g/kg)	悬尾实验累计静止不动时间/s	强迫游泳实验累计静止不动时间/s
空白对照组		151.60 ± 37.18	130.10 ± 20.28
盐酸氟西汀组	0.02	99.78 ± 20.96 ^a	83.89 ± 20.28 ^b
30%CCTE组	0.25	146.86 ± 32.59	111.00 ± 22.72
	0.50	133.60 ± 35.58	128.50 ± 34.94
	1.00	137.50 ± 39.09	128.80 ± 35.63
50%CCTE组	0.25	144.96 ± 40.20	116.40 ± 32.90
	0.50	120.20 ± 36.47	115.50 ± 46.82
70%CCTE组	0.125	101.20 ± 39.16 ^a	87.50 ± 28.05 ^a
	0.25	136.72 ± 28.36	104.20 ± 25.67
	0.50	98.00 ± 24.07 ^b	49.20 ± 16.71 ^b
90%CCTE组	0.125	103.43 ± 15.93 ^a	71.88 ± 10.79 ^b
	0.25	136.72 ± 28.36	98.80 ± 26.12
	0.50	131.20 ± 31.97	71.60 ± 48.87 ^b
	0.50	144.20 ± 49.31	82.88 ± 41.47 ^a

a:与空白对照组比较, $P < 0.05$;b:与空白对照组比较, $P < 0.01$

表2 50%、70%CCTE对5-HTP诱导的小鼠甩头行为的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g/kg)	甩头次数/次
空白对照组		32.17 ± 12.66
盐酸氟西汀组	0.02	84.64 ± 20.81 ^a
50%CCTE组	0.25	33.83 ± 12.79
	0.50	37.83 ± 18.47
	1.00	58.08 ± 20.98 ^a
70%CCTE组	0.25	35.92 ± 13.19
	0.50	56.50 ± 9.28 ^a
	1.00	64.83 ± 12.88 ^a

a:与空白对照组比较, $P < 0.01$

表3 50%、70%CCTE对利血平诱导的小鼠抑郁行为的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g/kg)	眼睑下垂评分	运动不能/只	肛温/°C
空白对照组		0	0	36.89 ± 0.18
模型组		2.60 ± 0.50 ^a	9 ^a	33.52 ± 0.13 ^a
盐酸丙咪嗪组	0.02	0.70 ± 0.90 ^b	3 ^b	35.80 ± 0.32 ^b
50%CCTE组	0.25	2.10 ± 1.00 ^a	8	34.96 ± 0.34
	0.50	1.90 ± 1.40 ^b	7	35.32 ± 0.22 ^b
	1.00	1.50 ± 0.20 ^b	5 ^c	36.32 ± 0.21 ^b
70%CCTE组	0.25	2.30 ± 1.00	7	35.43 ± 0.32 ^b
	0.50	2.20 ± 0.50 ^a	6 ^c	36.73 ± 0.12 ^b
	1.00	1.70 ± 0.50 ^b	5 ^b	36.50 ± 0.11 ^b

a:与空白对照组比较, $P < 0.01$;b:与模型组比较, $P < 0.01$;c:与模型组比较, $P < 0.05$

3.4 小鼠育亨宾毒性增强实验结果

与空白对照组相比,50%CCTE(1.00 g/kg)、70%CCTE(1.00 g/kg)及盐酸丙咪嗪(0.02 g/kg)均可显著增加死亡小鼠只数($P < 0.01$),表明50%、70%CCTE可明显增强育亨宾毒性。结果见表4。

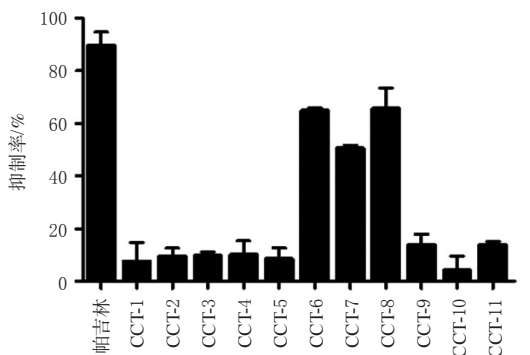
表4 50%、70% CCTE对育亨宾致小鼠毒性的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g/kg)	死亡只数
空白对照组		1
盐酸丙咪嗪组	0.02	8 ^a
50% CCTE组	0.25	2
	0.50	2
	1.00	6 ^a
70% CCTE组	0.25	3
	0.50	3
	1.00	7 ^a

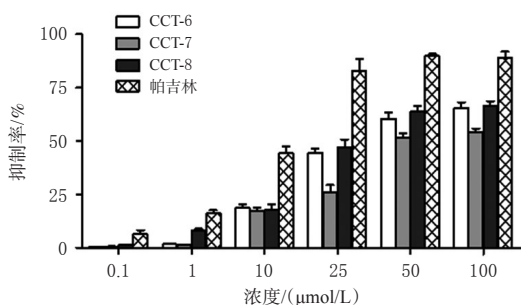
a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$

3.5 CCTE中多酚类物质对MAO的抑制作用

酶活性抑制实验结果如图1A所示:100 $\mu\text{mol/L}$ 阳性抑制剂帕吉林对MAO的抑制率为89.40%,等浓度的CCT-6、CCT-7、CCT-8对MAO的抑制率分别为65.10%、50.00%、65.80%,而其他8种多酚类物质对MAO的抑制率仅为4.30%~14.00%。进一步考察了0.10、1.00、10.00、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ 的CCT-6、CCT-7、CCT-8对MAO的抑制作用,结果如图1B所示:在浓度为0.10~50.00 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,CCT-6、CCT-7、CCT-8对MAO的抑制率随浓度增加而升高;当浓度为50.00 $\mu\text{mol/L}$ 时,三者抑制率分别为60.50%、51.70%、63.80%;此后当浓度增加至100.00 $\mu\text{mol/L}$ 时,三者抑制率增加不明显。通过计算可知,CCT-6、CCT-7、CCT-8和帕吉林对MAO的半数抑制浓度(IC_{50})分别为8.71、37.89、67.07、34.32 $\mu\text{mol/L}$,表明CCT-6、CCT-7、CCT-8对MAO均具有一定抑制作用。



A. CCTE中11个多酚类物质对MAO的抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$)



B. CCT-6、CCT-7、CCT-8对MAO的抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$)

图1 CCTE中多酚类物质对MAO的抑制实验结果

4 讨论

虽然雪菊提取物被科学研究证明具有多种药理活性,但尚未见其抗抑郁作用的报道。本文作者前期研究发现,雪菊75%乙醇提取物具有抗抑郁活性,因此本研究在此基础上,进一步探索其抗抑郁作用的有效部位,以便为其抗抑郁作用机制及活性物质的研究奠定基础。本课题组前期研究测得30% CCTE中11个多酚类物质含量依次为1.97%、8.08%、5.70%、0.70%、1.80%、0.17%、0.07%、0.417%、2.00%、0.33%,在50% CCTE中依次为18.30%、7.30%、1.80%、2.10%、3.30%、2.00%、3.80%、2.70%、0.70%、6.20%、1.00%。由此可见,不同极性洗脱部位中11个多酚类物质含量有较大不同。本研究发现,30% CCTE无抗抑郁作用,而50% CCTE具有抗抑郁作用,该作用是否与上述11个多酚类物质含量有关,有待进一步研究。同时,70% CCTE中化学成分与50% CCTE有何不同,尚需进一步研究。

通过小鼠悬尾实验和强迫游泳实验发现,50%、70% CCTE为雪菊抗抑郁作用的有效部位。由于抑郁发病机制复杂、病因机制学说较多,有单胺类神经递质假说、中枢神经营养因子与神经元可塑性假说、炎症因子假说、信号通路调节异常假说及氧化应激假说等,其中经典的单胺类神经递质假说认为,脑中5-HT、NE等单胺类神经递质浓度下降会导致抑郁症的发生。目前,临床常用的抗抑郁药均通过增加单胺类神经递质含量而发挥治疗作用^[20-21]。本研究为了进一步探讨雪菊有效部位抗抑郁作用是否与单胺类神经递质有关,采用药物诱导模型进行相关实验:当小鼠先给予帕吉林,再给予5-HTP后,其脑组织中5-HT浓度会明显升高,如果在此基础上继续给予抗抑郁药,则会使脑内5-HT浓度进一步升高,此时,大量的5-HT与突触后膜上的5-HT受体过度结合,从而引发甩头现象^[22]。本实验结果表明,50%、70% CCTE均可明显增加小鼠甩头次数,提示其抗抑郁作用可能与增加脑内5-HT浓度有关。利血平可抑制5-HT等单胺类神经递质的重摄取,致使5-HT、NE等递质聚集在突触间隙,又很快被此处的MAO降解,导致大量5-HT、NE耗竭,使小鼠表现出眼睑下垂、体温下降及四肢僵直等行为^[23-24]。本实验中,50%、70% CCTE均能逆转利血平诱导的小鼠眼睑下垂、肛温下降和运动不能,表明其抗抑郁作用可能与增加脑内5-HT等单胺类神经递质浓度有关。育亨宾可与突触前膜上的 α_2 NE受体结合并抑制该受体,从而使突触间隙内的NE释放量增加、NE能神经活性增强;在此基础上,如果再给予小鼠一些具有活化NE能神经的抗抑郁药,会使育亨宾的毒性增强,导致小鼠死亡率增加^[25]。本实验中,50%、70% CCTE均可明显增加育亨宾致小鼠死亡只数,提示

其抗抑郁作用可能与活化NE能神经有关。

本研究进一步通过体外抑制实验证实CCTE中含有的CCT-6、CCT-7、CCT-8等成分对MAO具有较好的抑制作用,进一步提示雪菊抗抑郁有效部位可能是通过其所含的CCT-6、CCT-7、CCT-8等成分抑制MAO活性从而维持脑内5-HT、NE等单胺类神经递质浓度来发挥抗抑郁作用^[26],但其机制及药效物质基础的明确尚需更深入、系统的研究。

综上所述,50%、70% CCTE为雪菊抗抑郁有效部位,并且其可能通过增加5-HT浓度及活化NE能神经来发挥抗抑郁作用;雪菊中CCT-6、CCT-7、CCT-8对MAO具有一定体外抑制作用,这可能是雪菊抗抑郁的作用机制之一。

参考文献

[1] 林易玮,张雨晨,王澜凝,等.抗抑郁抗焦虑药物的药理与临床[J].实用药物与临床,2020,23(1):1-4.

[2] 常军,章明星.抑郁症的发病机制及治疗研究进展[C]//第六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十二次中国中西医结合心身医学学术交流会议论文集.[出版者不详].2019:109-129.

[3] 周鸿铭,李铁臣.硫酸茯苓多糖抗抑郁作用机制的探讨[J].皖南医学院学报,2020,39(3):209-213.

[4] 付亚轩,孟宪钰,李明超,等.天麻抗抑郁药效物质及其作用机制研究进展[J].中草药,2020,51(21):5622-5630.

[5] THAXTER K A, YOUNG L E, YOUNG R E, et al. An extract of neem leaves reduces anxiety without causing motor side effects in an experimental model[J]. West Indian Med J, 2010, 59(3):245-248.

[6] 梁淑红,庞市宾,刘晓燕,等.金鸡纳提取物降血脂作用的动物实验研究[J].农垦医学,2009,31(6):495-498.

[7] 崔康康,姬凤彩,王志琴,等.新疆昆仑雪菊水提液对大鼠血压的影响[J].畜牧兽医科技信息,2013(7):17-19.

[8] 曹娅,王慎苓,潘广彦,等.昆仑雪菊化学成分及功能活性研究进展[J].中国果菜,2019,39(9):44-48.

[9] 张浦,何明,热沙来提,等.维药昆仑雪菊的研究进展[J].仲恺农业工程学院学报,2020,33(4):60-64,70.

[10] 李春燕,周中流,张华林,等.中药及天然药物化学成分抗抑郁作用研究进展[J].中成药,2018,40(7):1562-1570.

[11] 蒋莉,祁英,刘玉梅.随机质心映射优化法对新疆雪菊中黄酮和多酚提取工艺的研究[J].食品工业科技,2014,35(17):258-261,342.

[12] 徐永君,盛慧,倪鑫.抑郁症发病机制研究进展[J].安徽医科大学学报,2012,47(3):323-326.

[13] 李方园,盛婵娟,袁方玉,等.栀子提取物GJ-4对利血平

致抑郁症小鼠的作用及机制研究[J].中药新药与临床药理,2021,32(6):751-757.

[14] MA Z Y, ZHENG S R, HAN H X, et al. The bioactive components of *Coreopsis tinctoria* (Asteraceae) capitula: antioxidant activity *in vitro* and profile in rat plasma[J]. J Funct Foods, 2016, 20:575-586.

[15] 尤启冬.药物化学[M]. 8版.北京:人民卫生出版社,2016:99-103.

[16] 程瑞凤,景晶,华冰,等.甘草总黄酮提取部位抗小鼠抑郁活性可能与其增强中枢5-羟色胺能神经功能有关[J].中国药理学与毒理学杂志,2014,28(4):484-490.

[17] 丁振春,薛瑞,张亭亭,等.白芷冰片方对小鼠抑郁样行为的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2018,32(3):168-175.

[18] YOUDIM M B H, WEINSTOCK M. Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation[J]. Neurotoxicology, 2004, 25 (1/2) : 243-250.

[19] 张远冬,张有金,郭延垒,等. HPLC-UV法测定大鼠脑组织中5-羟色胺含量[J].中国现代药物应用,2012,6(21):14-16.

[20] 慕磊,孙建绪.抑郁症发病机制与抗抑郁药物作用靶标[J].国际药学研究杂志,2015,42(4):463-466.

[21] 高凤洁,贺海蓉,陈策,等.惊恐障碍急性期药物治疗和认知行为治疗及两者联合治疗疗效比较的网络Meta分析[J].中华精神科杂志,2021,54(6):461-475.

[22] THOMAS S J, SHIN M, MCINNIS M G, et al. Combination therapy with monoamine oxidase inhibitors and other antidepressants or stimulants: strategies for the management of treatment-resistant depression[J]. Pharmacotherapy, 2015, 35(4):433-449.

[23] 贾永囡,邹伟,孙晓伟,等.自制柴金解郁颗粒剂抗抑郁作用的药效学研究[J].中国药师,2019,22(4):601-605.

[24] FILHO C B, DEL FABBRO L, DE GOMES M G, et al. Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 698(1/2/3):286-291.

[25] 张森品,薛瑞,王洛萱,等.桑叶提取物对小鼠抑郁样行为的影响[J].国际药学研究杂志,2020,47(4):269-275.

[26] 杨扬,程慧洁,阮班锋.黄酮类化合物单胺氧化酶抑制作用研究进展[J].安徽化工,2017,43(2):7-12.

(收稿日期:2021-12-17 修回日期:2022-03-18)

(编辑:曾海蓉)