

利血平诱导的抑郁模型的研究进展[△]

宗 阳*,朱立静,孙冰婷,张 倩,居文政[#](南京中医药大学附属医院/江苏省中医院临床药理科,南京 210029)

中图分类号 R332 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2697-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.33

摘要 目的:为快速运用利血平诱导抑郁模型筛选抗抑郁中药提供参考。方法:以“利血平”“抑郁症”“中药抗抑郁”“Reserpine”“Depression”“Antidepressant drugs”“Depression and metabonomics”等为关键词,组合查询2004年1月—2016年4月在PubMed、中国知网、万方、维普、超星等数据库中关于利血平诱导的抑郁模型的实验研究文献,归纳总结后进行综述。结果:共检索到相关文献116篇,其中有效文献26篇。通过观察动物体质量变化及食物消耗情况、测量体温以及开场实验、强迫游泳实验、糖水偏好实验等结果和测定单胺类神经递质、代谢组学标志物等生化指标可以初步判定大鼠是否产生抑郁。大鼠腹腔注射利血平0.1~0.5 mg/kg适用于慢性抑郁症造模,4 mg/kg适用于急性抑郁症造模。结论:通过腹腔注射利血平可快速诱导抑郁模型,该模型可用于阐明中药治疗抑郁症的药效机制和为后期运用中药治疗抑郁症提供参考依据。

关键词 利血平;抑郁模型;行为学;生化指标;中药

抑郁症作为全球第四大疾患已越来越受人们的关注,经典的抗抑郁西药,如氟西汀、文拉法辛、帕罗西汀、舍曲林、氟伏沙明、西酞普兰等虽然在早期抗抑郁上效果不错,但已被美国FDA指出患者在长期服用这些抗抑郁西药后伴有自杀性倾向。虽然中药在抗抑郁上机制尚不明确,但抗抑郁靶点多且尚未发现能引起自杀倾向^[1]。利血平拮抗实验作为传统的药物诱导抑郁模型,相比于慢性不可预见性温和抑郁模型(CUMS)、电刺激、大鼠嗅球摘除等抑郁模型,具有造模时间短、减少动物的痛苦和操作简单等优点。笔者以“利血平”“抑郁症”“中药抗抑郁”“Reserpine”“Depression”“Antidepressant drugs”“Depression and metabonomics”等为关键词,组合查询2004年1月—2016年4月在PubMed、中国知网、万方、维普、超星等数据库中关于利血平诱导的抑郁模型的实验研究文献。结果,共检索到相关文献116篇,其中有效文献26篇。现就利血平诱导的抑郁模型的研究进展作如下综述,以期快速运用利血平诱导抑郁症筛选抗抑郁中药提供参考。

1 利血平抑郁模型的构建

利血平(Reserpine)是一种吲哚型生物碱,分子式为C₃₃H₄₀N₂O₉,存在于萝藦木属多种植物中,结构见图1。自20世纪50年代起利血平开始用于治疗高血压,是一种中枢镇静剂,长期使用利血平的患者会出现抑郁症状(Depression)^[2]。利血平是一种囊泡再摄取抑制剂,它使递质留在囊泡外,易被单胺氧化酶(MAO)降解,从而使儿茶酚胺类如去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)、多巴胺(DA)和5-羟色胺(5-HT)耗竭,引起行为和生理上的变化。对利血平引起的行为和生理变化的拮抗是最早发展的抑郁动物模型。经利血平处理的动物出现上眼睑下垂、体温下降及强直症状^[3],预先用三环抗抑郁药及MAO抑制剂处理,能拮抗上眼睑下垂及体温下降的症状。

虽然腹腔注射利血平构建抑郁模型已被广泛应用,但国内外注射剂量以及造模方式不尽相同。通过查阅国内外有关利血平造模实验,发现利血平主要用于抑郁症、帕金森症以及

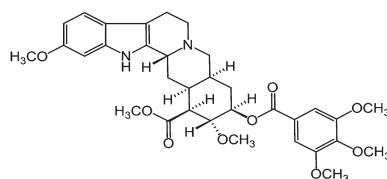


图1 利血平化学结构式

精神分裂症的造模。据文献报道,大鼠慢性抑郁造模利血平剂量在0.1~0.5 mg/kg之间,急性抑郁造模利血平剂量在1~5 mg/kg之间^[4-6]。

1.1 急性抑郁模型

冯飞等^[7]通过大鼠腹腔注射利血平2、4、6 mg/kg,于注射后1~2 h通过开场实验评价大鼠自发活动的改变,发现行为改变(48~72 h)可随利血平剂量的增加而减少,继续增加剂量则呈现出一种平台样变化,表明4 mg/kg腹腔注射为造模最佳剂量。

1.2 慢性抑郁模型

Antkiewicz-Michaluk L等^[8]通过大鼠腹腔注射0.2 mg/kg利血平(每天1次)持续2周,于末次注射2 h后通过开场实验、强迫游泳实验评价大鼠抑郁指标,发现模型组大鼠游泳不动时间明显大于正常组($P < 0.05$),水平和垂直得分明显少于正常组($P < 0.01$)。

1.3 模型构建流程

本课题组综合国内外有关利血平诱导的抑郁模型的造模方式以及预实验的实验结果,总结出利血平诱导的抑郁模型的造模流程,见图2。

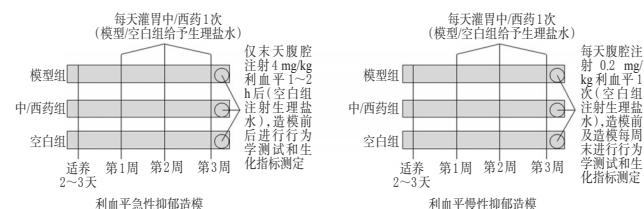


图2 利血平诱导急/慢性抑郁症的流程

2 行为学测试及生化指标测定

2.1 行为学测试

2.1.1 体质量及食物消耗 抑郁模型大鼠可出现食欲不振、

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81573685)

* 硕士研究生。研究方向:中药化学与分析。电话:025-86617141。

E-mail: 1181835152@qq.com

通信作者:主任药师,博士。研究方向:中药临床药理学。电话:025-86617141。E-mail: wzhju333@163.com

体质量降低等现象^[9],因此体质量变化及食物消耗情况可作为衡量模型大鼠抑郁程度的评判标准之一。本课题组通过预实验发现,利血平4 mg/kg组给药后大鼠1~2 h明显出现行为学抑郁并且开始绝食,隔天体质量明显下降;0.2 mg/kg组给药后大鼠隔天体质量及食欲没有太大变化。

2.1.2 体温 利血平通过耗竭脑内单胺类神经递质从而诱发动物体温下降、上眼睑下垂、运动不足和快感缺失等症状,故体温可作为衡量模型大鼠抑郁程度的另一评判标准。通过查阅相关大鼠体温测量方法^[10],最终采用红外非接触性体温测量仪测定大鼠体温。该方法快速、操作简单,减少了常规温度计对大鼠产生刺激进而引起的体温上升的误差。

2.1.3 开场实验(Open-field test) 开场实验是评价啮齿类实验动物运动功能和状态焦虑的经典方法,广泛应用于精神神经药理学的基础研究^[11]。近年来的研究关于动物开场实验的做法略有不同,主要体现在敞箱的制作上。本课题组自制50 cm×50 cm×50 cm的正方体敞口纸箱,内壁涂黑地面用白色油漆笔平均分成25个10 cm×10 cm的小方格,采用手机摄像并计时,清洗方箱内壁及底面,以免上次动物余留的气味影响下次测试结果。观察5 min内大鼠水平得分、垂直得分、自我修饰得分以及潜伏期。

2.1.4 强迫游泳实验(Forced swimming test) 强迫游泳实验本属于行为绝望(Behavioral despair)抑郁模型,利用大鼠不能逃逸出恶劣环境,以致行为绝望而设计出的一种抑郁造模方式^[12]。但在实际应用中往往通过观测大鼠的游泳不动时间、挣扎时间以及静止时间来作为其他抑郁模型的评价指标。同开场实验一样,对于游泳的器具选取各个研究室都不一样。本课题组选取直径50.5 cm×高52.0 cm(60 L)的塑料桶作为实验材料,实验中水温保持在25℃左右,水深不得低于15 cm,以免老鼠脚趾接触桶底。实验前一天预游15 min,24 h后测定5 min内老鼠各项指标,每次测定时更换水。

2.1.5 糖水偏好实验(Sugar water preference) 美国精神疾病诊断与统计手册第三版(DSM-III)认为抑郁症亚型的重要特征是对奖赏反应性的下降,即快感缺乏^[13]。而糖水偏好实验是检测啮齿类动物对奖赏的反应性最好方式,故糖水偏好可作为评价抑郁模型动物的指标之一。本课题组按照文献^[14],选取1%蔗糖水,具体方法如下:第1天,2瓶均装1%蔗糖水200 ml;第2天,1瓶1%蔗糖水和1瓶纯净水,各200 ml;第3天,禁食禁水;第4天,1瓶1%蔗糖水和1瓶纯净水,各200 ml;第5天,测量糖水以及纯净水消耗量。糖水偏好系数=糖水消耗量/(糖水+纯净水消耗量)×100%。通过测定第5天消耗的糖水以及纯净水的量计算大鼠的糖水偏好系数,从而比较正常组与模型组之间的差异。

2.2 生化指标

近年来,有关抑郁状态下动物体内生物标志物(Biomarker)的研究越来越多。本课题组就利血平诱导的抑郁模型从单胺类神经递质及其受体假说以及代谢组学的角度来探讨抑郁症的治疗方案,就现阶段基于这两方面的测定技术以及结果进行总结。

2.2.1 单胺类神经递质 动物脑中5-HT、DA、NE等单胺类神经递质功能不足是导致抑郁状态的原因之一,即单胺类神经递质假说^[15]。基于这一假说,大多研究抑郁症模型时都会采用不同的方式来检测动物脑组织:下丘脑、纹状体、中脑腹侧被盖区(VTA)、伏隔核以及血液中的单胺类成分含量的变化。

对于上述几种单胺类成分的测定主要有两种方式:一是

酶联免疫吸附法(ELISA);二是以高效液相色谱(HPLC)为分离基础,配以不同的检测器,如质谱检测器(MS)、电化学检测器(ECD)、荧光检测器(FD)等。相比较第一种方法的简单、快速而言,第二种方法具有高灵敏度、高选择性以及稳定性等特点,可以定量分析。

2.2.2 代谢组学标志物 大量实验以及临床研究表明,病理状态下生物机体中代谢物质变化与正常状态下有明显差别。而抑郁症的发病机制非常复杂,其病理生理学异常涉及体内的多个系统,目前研究认为抑郁症发病与神经、免疫、内分泌等系统功能紊乱密切相关^[16]。现阶段研究抑郁症大多从单一的方面着手,很难有效治疗抑郁症,而代谢组学属于系统生物学的范畴,可以很好地反映抑郁状态,这一理论很符合中医的治疗疾病的“整体思想”。

代谢组学标志物的研究步骤主要包括样品采集与制备、样品分析与鉴定、数据处理与分析3个部分。样品最常用的是尿液、血浆或血清,大鼠生物样品采集主要通过代谢笼、眼眶取血,制备一般采用蛋白沉淀、液-液萃取和固相萃取等;样品分析与鉴定最常用的分析技术是核磁共振(NMR)、气-质联用(GC-MS)和液-质联用(LC-MS)等;数据处理与分析方法以主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和随机森林分析等最为常用。仪器分析与化学信息分析是代谢组学标志物研究的关键环节。研究表明,人体抑郁状态下氨基酸类如谷氨酸盐、谷氨酰胺、 γ -氨基丁酸、色氨酸和5-HT、胱氨酸等,脂肪酸类如脑黄金(DHA)、二十二碳五烯酸(DPA)、5-羧二十碳四烯酸(5-HETE)、12-HETE,能量代谢类如1,5-脱水葡萄糖醇、乳酸、丙酮酸等,类固醇代谢类如皮质醇、可的松、脱氢表雄酮硫酸盐(DHEA-S)等,血红素代谢类如血红素、胆红素(E, E)和胆红素(Z, Z)^[17],共66个化合物与正常状态下比较都会发生显著性差异($P < 0.05$)。这些化合物涉及的代谢通路为抑郁症发病机制的研究提供了方向。

3 中药治疗利血平诱导的抑郁模型的研究

西医治疗抑郁症大多基于单胺类神经递质及其受体假说、炎症反应假说、下丘脑-垂体-肾上腺(HPA轴)功能失调假说、神经营养因子假说以及多因素综合作用假说等^[18]。其治疗抑郁症的主要药物有三环类抗抑郁药、MAO抑制剂和可逆性选择性MAO抑制药、5-HT及NE再摄取抑制药、NE及DA再摄取抑制药等^[19]。虽然西药能在不同程度上改善抑郁状态,但这些药物的副作用较大,主要有冷漠、疲劳、睡眠障碍、认知功能障碍、性功能障碍、中风等^[20]。不同于西药抗抑郁是以调节单一的作用靶点,中药具有多途径、多靶点、散弹式的治疗特点^[21],尽管单一成分含量低、作用不明显,但可通过多环节起作用,具有协同效应。中药抗抑郁机制见图3。

总结近几年有关研究中药治疗利血平诱导的抑郁模型的文献报道,中药复方治疗抑郁症的有甘麦大枣汤、柴胡疏肝散、逍遥散等^[22-23]。治疗抑郁症的中药活性成分中,黄酮类有甘草总黄酮、葛根异黄酮、丹参酮、黄芩总黄酮、姜黄素等;生物碱类有酸枣仁总生物碱、黄连生物碱、茶叶嘌呤生物碱等;苷类有二苯乙炔苷、芍药苷、甾白总苷、黄精皂苷等;挥发油类有积雪草挥发油、南葶苈子油等;其他有阿魏酸、蛤蟆油石油醚、瓜丁胺、大黄素甲醚等。这些中药复方以及活性成分大多通过多种作用机制协同治疗抑郁症,符合中医治疗抑郁症的“整体思想”。

4 结语

现阶段对于抑郁症的造模方式主要有应激模型、脑损伤

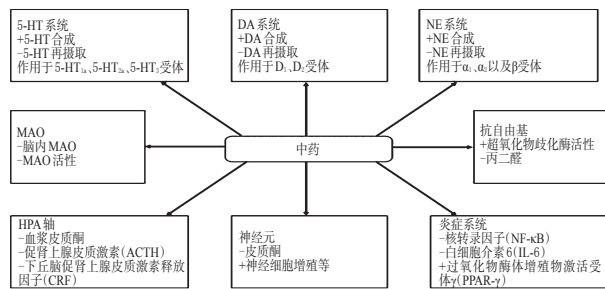


图3 中药抗抑郁机制

注：“+”表示增加或提高；“-”表示减少或降低

模型、操作行为模型、药物相互作用模型等^[24-25]。而利血平诱导的抑郁模型主要通过耗竭脑内单胺类神经递质而引起抑郁状态。该模型具有造模时间短、操作简单和动物痛苦较轻等优点而被广泛用于抑郁症造模。国内实验室大多采用大鼠腹腔注射 4 mg/kg 利血平诱导抑郁症,而很少采用大鼠腹腔注射 0.2 mg/kg 利血平长期给药诱导抑郁症,虽然两种造模方式都能达到抑郁效果,但后者与临床上报道的长期使用利血平产生抑郁症更为符合。

中药治疗抑郁症的研究大多还停留在实验阶段,真正应用于临床上的很少。利血平诱导的抑郁模型为快速地筛选出治疗抑郁症的中药有效成分及药效评价研究提供了便利。近年来,利血平诱导的抑郁模型被运用于中医上肝阳虚型抑郁症^[26]的造模,但其判断的标准只局限于中医上的简单证候的对应关系,是否可以将利血平诱导的抑郁症定义为肝阳虚型抑郁症还有待研究。代谢组学标志物的研究对于中药抗抑郁提供了新的研究方向,即:不能停留在用西药思维方式研究中药的怪圈,应该结合中医药理论,从整体角度寻找适合中药药效物质基础研究的新方法、新手段。

对于治疗抑郁症的中医药复方及其活性成分的探讨和研究不能局限在一种造模方式和某种假说上的成功,而应该多种抑郁模型相结合,从而找出适合于不同抑郁模型下的药物。在不同抑郁模型下进行代谢组学标志物的研究,这更加符合中医上的“辨证论治”,可为中西医结合治疗抑郁症提供更好的研究方向。

参考文献

[1] Farahani MS, Bahramsoltani R, Farzaei MH, et al. Plant-derived natural medicines for the management of depression: an overview of mechanisms of action[J]. *Rev Neurosci*, 2015, 26(3):305.

[2] Leith NJ, Barrett RJ. Effects of chronic amphetamine or reserpine on self-stimulation responding: animal model of depression? [J]. *Psychopharmacology*, 1980, 72(1):9.

[3] 卢海啸,王琼秋,李家洲,等.二色桂木正丁醇提取物的抗抑郁活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(16):156.

[4] Fernandes VS, Ribeiro AM, Melo TG, et al. Memory impairment induced by low doses of reserpine in rats: possible relationship with emotional processing deficits in Parkinson disease[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008, 32(6):1479.

[5] Fernandes VS, Santos JR, Leão AH, et al. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease[J]. *Behav Brain Res*, 2012, 231(1):154.

[6] 胡一冰,赵钢,姚倩,等.近20年国内抑郁症动物模型应

用研究[J].山西中医,2008,24(增刊):84.

[7] 冯飞,许崇涛.利血平抑郁模型的剂量探讨[J].汕头大学医学院学报,2007,20(4):223.

[8] Antkiewicz-Michaluk L, Wasik A, Mozdzeń E, et al. Antidepressant-like effect of tetrahydroisoquinoline amines in the animal model of depressive disorder induced by repeated administration of a low dose of reserpine: behavioral and neurochemical studies in the rat[J]. *Neurotox Res*, 2014, doi:10.1007/s12640-013-9454-8.

[9] 薛涛,郭丽莎,刘新民,等.抑郁症动物模型及评价方法研究进展[J].中国实验动物学报,2015,23(3):321.

[10] 李飞艳,杜缙,曹娟,等.3种体温计测量大鼠体温的比较研究[J].中国医药指南,2012,10(27):455.

[11] 孙世光,王婧婧,李自发,等.旷场实验:昆明小鼠行为学评价方法的重测信度检验[J].中华行为医学与脑科学杂志,2010,19(12):1093.

[12] 李仲铭,徐成丽,朱广瑾.强迫游泳动物模型的研究进展[J].中国行为医学科学,2004,13(5):595.

[13] 何松彬.糖水试验在慢性应激抑郁大鼠模型中的应用价值[C].杭州:中华航海医学会第六届航海心理学专业委员会学术会议论文集,2010:14-16.

[14] 侯金良,魏盛,杜希扬,等.抑郁情绪大鼠模型中糖水偏好实验数据的聚合分析[J].实验动物与比较医学,2012,32(3):182.

[15] Antkiewicz-Michaluk L, Wąsik A, Michaluk J, et al. 1-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous amine with unexpected mechanism of action: new vistas of therapeutic application[J]. *Neurotox Res*, 2014, 25(1):1.

[16] 马宗国,江南,余梦瑶,等.抑郁症发病机制及中药治疗研究进展[J].中国实验动物学报,2011,19(6):548.

[17] 和昱辰.抑郁症患者血清代谢物及组学的初步研究[D].重庆:第三军医大学,2014:44-45.

[18] 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.

[19] 陈菁,康银花.聚焦抑郁症治疗药物[J].药学进展,2014,38(11):855.

[20] Juang HT, Chen PC, Chien KL. Using antidepressants and the risk of stroke recurrence: report from a national representative cohort study[J]. *BMC Neurol*, 2015, doi:10.1186/s12883-015-0345-x.

[21] 尚沛津,李玉文,张一恺,等.中药药效物质基础的研究进展[J].中国药房,2015,26(28):4000.

[22] 宗阳,何书芬,孙冰婷,等.甘草抗抑郁作用机制研究及应用概况[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(10):194.

[23] 蒋美琼,苗明三.中医药治疗抑郁症特点分析[J].中医学报,2013,28(12):1881.

[24] 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010:643-651.

[25] Czéh B, Fuchs E, Wiborg O, et al. Animal models of major depression and their clinical implications[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2016, doi:10.1016/j.pnpbp.2015.04.004.

[26] 吕士选,岳凤先.从中医理论角度探讨利血平的药理作用[J].中国中西医结合杂志,1995,15(3):177.

(收稿日期:2015-10-15 修回日期:2016-05-11)

(编辑:余庆华)