

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20240201

药学专题

益智醇提取物抗抑郁活性研究

甘安娜, 王诗宇, 晋炎君, 吴博, 颜廷旭, 贾英[✉]
(沈阳药科大学功能食品与葡萄酒学院, 辽宁 沈阳 117004)

【摘要】目的:研究益智醇提取物(AOY)的抗抑郁活性,初步明确其作用机制。方法:采用小鼠耳肿胀实验以及小鼠棉球肉芽肿实验考察AOY的抗炎能力;采用DPPH自由基、ABTS自由基、羟基自由基以及超氧阴离子自由基清除力的体外抗氧化模型考察AOY的抗氧化能力;采用慢性不可预知温和应激(CUMS)小鼠模型,用强迫游泳实验(FST)、糖偏好实验(SPT)以及悬尾实验(TST)等行为学实验考察其抗抑郁活性;通过测定小鼠海马中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶-2(COX-2)的水平和核转录因子(NF- κ B)、炎症小体(NLRP3)以及白介素-1 β (IL-1 β)的含量,探究其作用机制。结果:益智醇提取物能够抑制小鼠的急性炎症和慢性炎症;且在一定浓度下与维生素C(VC)的抗氧化水平相当,表明AOY有很好的抗氧化活性;AOY能显著增强糖偏好实验中小鼠的糖偏好程度,并显著降低小鼠在悬尾实验以及强迫游泳实验中的不动时间。给予AOY后,小鼠海马体中SOD和GSH-Px活性升高,iNOS、COX-2、NF- κ B、NLRP3和IL-1 β 含量降低。结论:AOY具有良好的抗炎抗氧化活性,且AOY能同时作用于炎症反应和氧化应激通路发挥抗抑郁作用。

【关键词】益智;抗炎;抗氧化;抑郁症;行为学

【引用格式】

甘安娜,王诗宇,晋炎君,等.益智醇提取物抗抑郁活性研究[J].中医药信息,2024,41(2):1-8.

GAN A N, WANG S Y, JIN Y J, et al. Antidepressant activity of sharp-leaf glangal fruit alcohol extract [J]. Information on TCM, 2024, 41(2):1-8.

抑郁症是一种常见的精神障碍,患者表现为心境低落、精神沮丧、焦虑恐慌、意志活动、反应力减退等症状,是一种被公认为具有高患病率、高致残率、高致死率的慢性精神疾病^[1]。世界卫生组织指出,随着时间的推移,抑郁症的患者将会逐年增加,预计到2030年,西方国家抑郁症的患病率预计将会排在首位。抑郁症的发病机制及生理病因尚未明确,故其药物治疗效果及预后康复并不如人意^[2]。我国抑郁症发病率也存在逐年上升趋势,且目前主要的抗抑郁药物治疗效果满足不了患者的需求,而中医药凭借其副作用小等优点,越来越广泛地应用于抑郁症的临床治疗中^[3]。

益智(sharp-leaf glangal fruit)是姜科山姜属的多年生植物益智(*Alpinia oxyphylla* Miq.)的干燥成熟果实,始载于《本草拾遗》^[4],为中国四大南药之一^[5]。主产于海南、广东、广西、福建等地,为海南道地药材,是卫生部公布的药食同源的药材之一^[6]。2020版《中华人民共和国药典》记载本品性温味辛,入脾、胃经,有温脾止泻、摄涎、肾虚遗尿、小便频数、遗精白浊的功效^[7]。现代药理和临床研究表明,益智具有镇静、镇痛、抗肿瘤、抗应激、抗氧化、抗衰老、强心、抗溃疡、止泻、降血脂和保肝提高记忆力等作用。益智的黄酮类化合物有抗抑郁的活性^[8],为了更好地了解益智治疗

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82173961)

第一作者简介:甘安娜(1999-),女,2023级中药学博士研究生,主要研究方向:中药药效物质基础、中药质量控制与质量评价及中药活性成分代谢组学研究。

✉通信作者简介:贾英(1969-),女,教授,博士研究生导师,主要研究方向:中药药效物质基础、中药质量控制与质量评价及中药活性成分代谢组学研究。

抑郁的作用机制,本实验从氧化应激以及炎症的方向研究益智的抗抑郁作用。

1 材料

1.1 动物

健康昆明种 SPF 级小鼠,由沈阳药科大学动物管理中心提供,雄性,体质量约 25 g,合格证号:SCXK(辽)2020-0001。

1.2 药材

益智(辽宁省沈阳市同仁堂药店)经沈阳药科大学功能食品与葡萄酒学院贾英教授鉴定为益智(*sharp-leaf glangal fruit*),是姜科(*Zingiberaceae*)多年生植物益智(*Alpinia oxyphylla* Miq.)的干燥成熟果实。

1.3 药品与试剂

羧甲基纤维素钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20190318);生理盐水(辰欣药业股份有限公司,批号:230314D04);95%乙醇(沈阳市富康消毒药剂厂,批号:20220322);氟西汀、DPPH、ABTS、VC(大连美伦科技有限公司,批号:M0905A、CHB210105、S0929C、F0221A);冰醋酸、铁氰化钾、水杨酸、过氧化氢、盐酸(山东禹王实业有限公司,批号:20200418、20150507、20220801、20190105、20220519);过硫酸钾、邻苯三酚(西陇化工股份有限公司,批号:20210121、20200928);超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(碧云天生物技术有限公司,批号:122921220922);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒、一氧化氮合成酶(NOS)分型测试盒(南京建成生物科技有限公司,批号:20211120、20201028);环氧合酶-2(COX-2)测试盒、核因子- κ B(NF- κ B)ELISA检测试剂盒、炎症小体(NLRP3)ELISA检测试剂盒、白介素-1 β (IL-1 β)ELISA检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:ml0442236-J、ml063331、ml037234、mIC50300-1)。

1.4 仪器

BP210S型电子分析天平(德国Sartorius公司);数显电热恒温水浴锅HH-4(国华电器有限公司);KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DZTW调温电热套(北京市永光明医疗仪器厂);离心机TGL-16C(上海安亭科学仪器厂);Varioskan Flash酶标仪(默飞世尔科技公司);旋转蒸发器RE-52A(上海亚荣生化仪器厂);BP210S型电子分析天平(德国Sartorius公司);真空泵SHZ-III(上海亚荣生化仪器厂);ZS-ZFT自发活动视频分析系统(安徽淮北正华生物仪器设备有限公司);DY89-II匀浆机(宁波新芝生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 益智醇提物的制备

取益智干燥品 400 g,粉碎,加 10 倍体积的 95% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 h。过滤后,合并滤液,减压回收乙醇至无醇味,蒸干后,收集益智提取物浸膏 60.5 g。益智醇提物浸膏需用 CMC-Na 溶液助溶。

2.2 二甲苯致小鼠耳肿胀实验

小鼠经环境适应性喂养一周后,将小鼠随机分为对照组(Control组)、阿司匹林组(Aspirin组)、益智醇提物低剂量给药组(AOY treated group I组)和益智醇提物高剂量给药组(AOY treated group II组),每组 10 只。对照组灌胃给予 CMC-Na;阿司匹林组灌胃给予阿司匹林肠溶片溶液(200 mg/kg);益智醇提物低剂量给药组灌胃给予益智醇提物 150 mg/kg;益智醇提物高剂量给药组灌胃给予益智醇提物 300 mg/kg。

小鼠连续给药 7 d,每日 1 次,给药剂量 0.01 mL/g。末次给药后 30 min,将小鼠耳朵用蒸馏水冲洗,取 100% 二甲苯 50 μ L 均匀涂于小鼠右耳前后两面致炎。1 h 后用游标卡尺测量给予二甲苯前后的耳廓厚度,计算耳肿胀度和肿胀度的抑制率。

$$\text{耳肿胀度(mm)} = \text{致炎后小鼠耳廓厚度(mm)} - \text{致炎前小鼠耳廓厚度(mm)}$$

$$\text{肿胀抑制率(\%)} = (\text{空白组平均肿胀度} - \text{给药组平均肿胀度}) / \text{空白组平均肿胀度} \times 100\%$$

2.3 小鼠棉球肉芽肿实验

小鼠经环境适应性喂养一周后,将小鼠随机分为对照组(Control组)、阿司匹林(Aspirin组)、益智醇提物低剂量给药组(AOY treated group I组)和益智醇提物高剂量给药组(AOY treated group II组),每组 10 只。对照组灌胃给予 CMC-Na;阿司匹林组灌胃给予阿司匹林肠溶片溶液(200 mg/kg);益智醇提物低剂量给药组灌胃给予益智醇提物 150 mg/kg;益智醇提物高剂量给药组灌胃给予益智醇提物 300 mg/kg。

小鼠连续给药 7 d,每日 1 次,给药剂量 0.01 mL/g。腹腔注射水合氯醛 400 mg/kg 麻醉,在小鼠的背部正中央去毛用碘酒消毒,75% 酒精棉脱碘后,用手术剪刀开 0.5 cm 长的小口,用眼科镊子将质量为 5 mg 的灭菌棉球植入皮下,随即缝合小鼠皮肤。末次给药后 24 h,打开切口,将棉球连同周围结缔组织一起取出,剔除脂肪组织,在 80 $^{\circ}$ C 烘箱中恒温干燥 12 h 后,称重,将称得的重量减去棉球重量(5 mg),即得肉芽肿重量。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{模型组肉芽肿质量} - \text{给药组肉芽肿质量}}{\text{模型组肉芽肿质量}} \times 100\%$$

2.4 抗氧化活性实验

2.4.1 DPPH自由基清除能力的测定

参照文献[9]中的方法做适当修改。用无水乙醇制备浓度为 6.5×10^{-5} mol/L 的 DPPH 自由基(\cdot DPPH)储备液,在试管中依次加入不同浓度的供试品溶液 1.5 mL 和 DPPH 自由基储备液 2.5 mL,摇匀并于暗处静置 30 min,在 517 nm 波长处测定其吸光度分别记为 $A_i(i=1 \sim 10)$;以 1.5 mL 无水乙醇代替供试品溶液测得的吸光度为空白吸光度记为 A_0 ;以无水乙醇代替 DPPH 自由基储备液测得的吸光度为供试品本底吸光度记为 A_j ;每个浓度同时做 3 个平行样,取吸光度的平均值,以 VC 做阳性对照,按照以上方法处理并测定吸光度,计算供试品溶液对 DPPH 的抑制率,并计算出 IC_{50} 值。

$$\text{自由基抑制率}(\%) = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\% \quad (1)$$

2.4.2 ABTS 自由基清除能力的测定

参照文献[10]中的方法做适当修改。用无水乙醇制备浓度为 7.00 mmol/L 的 ABTS 溶液,量取 ABTS 溶液 10 mL 加入提前配好的 2.45 mmol/L $K_2S_2O_8$ 水溶液 10 mL,在避光的条件下室温放置过夜,形成一定浓度的 ABTS 自由基(\cdot ABTS⁺)储备液,下一步实验前用无水乙醇稀释至 734 nm 波长处吸光度为 (0.700 ± 0.02) 左右,备用。在试管中依次加入不同浓度的供试品溶液 0.1 mL 和稀释后的 ABTS 自由基溶液 5.0 mL,充分混匀后避光放置 6 min,在 734 nm 波长处测其吸光度 $A_i(i=1 \sim 10)$;以 0.1 mL 无水乙醇代替供试品溶液测得的吸光度为空白吸光度记为 A_0 ;以 5.0 mL 无水乙醇代替 ABTS 溶液测得的吸光度为供试品本底吸光度记为 A_j ;每个浓度同时做 3 个平行样,取吸光度的平均值,以 VC 做阳性对照,按公式(1)计算供试品对 ABTS 自由基的抑制率,并计算出 IC_{50} 值。

2.4.3 羟基自由基清除能力的测定

参照文献[11]中的方法做适当修改。在试管中加入配好的 9 mmol/L 硫酸亚铁溶液 1.0 mL 和 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 2.0 mL,混匀,不同浓度的供试品溶液 2.0 mL,加入 8.8 mmol/L 过氧化氢溶液 2.0 mL 启动反应,37 °C 水浴放置 30 min 后于 510 nm 处测得吸光度 $A_i(i=1 \sim 10)$,以 2.0 mL 无水乙醇代替供试品溶液测得的吸光度为空白吸光度记为 A_0 ,以 2.0 mL 无水乙醇代替水杨酸-乙醇溶液测得的吸光度为本底吸光度记为 A_j 。每个浓度同时做 3 个平行样,取吸光度的平均值,以 VC 做阳性对照,按公式(1)计算样品对 \cdot OH

自由基的抑制率,并计算出 IC_{50} 值。

2.4.4 超氧阴离子清除能力的测定

参照文献[12]中的方法做适当修改。在试管中加入提前配制好的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH = 8.2)4.5 mL 和蒸馏水 4.2 mL,充分混匀,于 25 °C 水浴中放置 20 min,取出后立即加入用 HCl 配制的 3 mmol/L 邻苯三酚 0.3 mL,空白管中用 HCl 代替邻苯三酚 HCl 溶液,迅速摇匀,然后在 325 nm 每隔 30 s 测定一次吸光度值 A ,邻苯三酚的自氧化速率 A_1 是在线性范围内每 1 min 吸光度的增加值。取 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL、供试品 1.0 mL 和蒸馏水 3.2 mL 混匀,其他步骤同上,邻苯三酚的自氧化速率 A_2 是在线性范围内每 1 min 吸光度的增加值。每个浓度同时做 3 个平行样,取吸光度的平均值,以 VC 做阳性对照,按公式(2)计算样品对 \cdot O₂ 的抑制率,并计算出 IC_{50} 值。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}(\%) = \frac{(A_1 - A_2)/A_1 \times 100\%}{\quad} \quad (2)$$

2.5 慢性不可预知温和应激(CUMS)小鼠模型实验

造模方式:①禁食 24 h;②禁水 24 h;③斜笼饲养 24 h;④无垫料饲养 24 h;⑤昼夜颠倒 12 h;⑥湿笼饲养 24 h;⑦噪声 4 h;⑧冰水游泳 5 min;⑨夹尾 1 min。以上造模方式必须随机单独进行 4 周。

小鼠适应一周后,将 48 只小鼠随机分为 6 组,具体分组及给药情况如下:空白组(Control 组)灌胃给予 CMC-Na; CUMS 组(CUMS)灌胃给予 CMC-Na; CUMS-阳性药组(CUMS-FLU)腹腔给予氟西汀(12 mg/kg);空白给药组(Control-AOY)灌胃给予益智醇提取物(300 mg/kg);CUMS-益智醇提取物低剂量给药组(CUMS-AOY I)灌胃给药(150 mg/kg);CUMS-益智醇提取物高剂量给药组(CUMS-AOY II)灌胃给药(300 mg/kg)。

其中 CUMS 组、CUMS-阳性药组、CUMS-益智醇提取物低剂量给药组和 CUMS-益智醇提取物高剂量给药组小鼠进行连续 4 周的 CUMS 造模。实验进行到第 7 天时,空白组和 CUMS 组小鼠分别连续 3 周灌胃给予 0.5% CMC-Na,每天 1 次;CUMS-阳性药组连续 3 周腹腔注射给予 FLU,每天 1 次;空白给药组、CUMS-益智醇提取物高剂量给药组以及 CUMS-益智醇提取物低剂量给药组连续 3 周给予益智醇提取物,每天 1 次。实验第 28 天对各组小鼠依次进行糖偏好实验,第 29 天后进行强迫游泳实验以及悬尾实验,第 30 天处死动物,迅速取出小鼠全脑,将其放在生理盐水中低温保存,将大脑中的海马组织取出放在 -80 °C 超低温冰箱进行保存,并按试剂盒说明对其进

行生化检测。

2.5.1 糖偏好实验(SPT)

将小鼠放到一个含有两瓶浓度都为1%的糖水水瓶的笼子当中适应24 h,然后断水24 h,再将小鼠放在笼中饲养,并在该笼左右放进2只水瓶,水瓶中分别装有100 mL糖水和100 mL水,12 h之后记录糖水和水的消耗情况。

糖水偏好指数SP(sucrose preference) =

$$\text{糖水消耗量} / (\text{糖水消耗量} + \text{水消耗量}) \times 100\%$$

2.5.2 强迫游泳实验(FST)

将小鼠放进一个装有水的烧杯中(烧杯高25 cm,直径14 cm,水深10 cm),水温控制在24~26℃。一次实验进行6 min,小鼠适应时间为2 min,然后观察记录小鼠后4 min的游泳情况。其中小鼠不动的标志是只做基本的保持头部不下沉的运动。

2.5.3 悬尾实验(TST)

将小鼠尾巴固定在30 cm高度的横杆上,头部向下,一次实验进行6 min,小鼠适应2 min,然后观察记录小鼠后4 min的挣扎情况。小鼠不动的标志是只做基本的保持头部向下不动的行为。

2.6 生化指标检测

按照试剂盒说明书进行操作处理试剂,并根据标准品的浓度及相对应的吸光度值,计算出标准曲线的直线回归方程,再根据样品的吸光度值,计算出对应的SOD、GSH-Px、iNOS、COX-2、NF-κB、NLRP3和IL-1β样品浓度。

2.7 统计学方法

采用SPSS19.0统计软件进行分析,行为学实验数据和生化指标测定数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间参数比较采用One-way ANOVA和Student's *t*-test进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠耳肿胀情况比较

小鼠的左耳在实验结束后耳廓厚度并无明显的差异,可以排除小鼠之间的个体差异的影响。小鼠右耳耳廓经二甲苯致炎后,出现了明显的肿胀,与空白组比较,阿司匹林组($P < 0.01$,抑制率58.34%)、益智醇提取物高低剂量给药组($P < 0.01$,抑制率41.67%、25.00%)表现出显著的肿胀抑制作用。结果表明,益智醇提取物能够抑制二甲苯所造成小鼠的急性炎症,且高剂量的AOY给药效果更好。结果见表1。

表1 各组小鼠耳肿胀实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	左耳/mm	右耳/mm	肿胀程度/mm	抑制率/%
Control组	10	0.15 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.12 ± 0.02	—
Aspirin组	10	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.02**	0.05 ± 0.02**	58.34
AOY treated group I组	10	0.16 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.09 ± 0.01**	25.00
AOY treated group II组	10	0.16 ± 0.02	0.23 ± 0.03**	0.07 ± 0.03**	41.67

注:与Control组比较,** $P < 0.01$ 。

3.2 各组小鼠棉球肉芽肿情况比较

与空白组比较,阿司匹林组($P < 0.01$,抑制率48.60%)、益智醇提取物高剂量给药组($P < 0.01$,抑制率35.49%)以及益智醇提取物低剂量给药组($P < 0.05$,抑制率14.77%)表现出显著的肿胀抑制作用。结果表明,益智醇提取物能够抑制小鼠的慢性炎症,且高剂量的AOY给药效果更好。结果见表2。

表2 各组小鼠棉球肉芽实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肉芽/mg	抑制率/%
Control组	10	13.27 ± 2.89	—
Aspirin组	10	6.82 ± 1.78**	48.60
AOY treated group I组	10	11.31 ± 1.68*	14.77
AOY treated group II组	10	8.56 ± 1.86**	35.49

注:与Control组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

3.3 益智醇提取物对自由基清除能力的影响

3.3.1 益智醇提取物对DPPH自由基清除能力

DPPH是一种稳定的氮中心的自由基,广泛用于

定量测定中药和食品的抗氧化能力。益智醇提取物在0.2~80 mg/mL范围内,随着浓度的升高DPPH自由基的清除能力增强,当浓度为2 mg/mL时,清除能力达93.1%,接近VC水平,IC₅₀ = 0.36 mg/mL。结果见表3。

表3 不同浓度AOY DPPH自由基清除能力比较($\bar{x} \pm s$)

浓度/(mg/mL)	n	AOY/%	VC/%
0.2	3	36.28 ± 0.13	68.25 ± 0.67
0.5	3	64.51 ± 0.45	89.90 ± 0.17
1	3	80.68 ± 0.40	94.84 ± 0.50
2	3	93.10 ± 0.89	95.95 ± 0.49
5	3	93.04 ± 0.14	94.98 ± 0.14
10	3	94.87 ± 0.15	95.43 ± 0.68
20	3	94.84 ± 0.28	97.23 ± 0.68
40	3	94.83 ± 0.71	96.94 ± 0.68
60	3	95.70 ± 0.87	97.83 ± 0.15
80	3	95.83 ± 0.15	97.82 ± 0.14

3.3.2 益智醇提取物对ABTS自由基清除能力

在适当的氧化剂作用ABTS可氧化成绿色的

ABTS 自由基, 当有抗氧化剂存在时可抑制自由基的产生, 在 734 nm 处测定吸光度可计算供试品的抗氧化能力。益智醇提物在 0.2 ~ 80 mg/mL 范围内, 随着浓度的升高 ABTS 自由基的清除能力增强, 当浓度为 5 mg/mL 时, 清除能力达 95.8%, 接近 VC 水平, $IC_{50} = 1.92$ mg/mL。结果见表 4。

表 4 不同浓度 AOY ABTS 自由基清除能力比较($\bar{x} \pm s$)

浓度/(mg/mL)	n	AOY/%	VC/%
0.2	3	14.62 ± 0.33	80.33 ± 0.21
0.5	3	24.61 ± 0.24	94.95 ± 0.18
1	3	32.36 ± 0.17	98.41 ± 0.21
2	3	54.76 ± 0.17	99.16 ± 0.16
5	3	95.80 ± 0.18	99.96 ± 0.16
10	3	97.35 ± 0.18	99.37 ± 0.21
20	3	97.35 ± 0.19	98.34 ± 0.20
40	3	98.77 ± 0.25	98.84 ± 0.19
60	3	97.45 ± 0.18	99.06 ± 0.16
80	3	98.66 ± 0.17	99.50 ± 0.21

3.3.3 益智醇提物对羟基自由基清除能力

羟基自由基的反应活性很高, 若将反应体系加入水杨酸能够有效捕捉羟基自由基, 同时产生有色物质, 在 510 nm 波长处有强吸收。益智醇提物在 0.2 ~ 80 mg/mL 范围内, 随着浓度的升高羟基自由基的清除能力增强, 当浓度为 20 mg/mL 时, 清除能力达 90.1%, 接近 VC 水平, $IC_{50} = 7.18$ mg/mL。结果见表 5。

表 5 不同浓度 AOY 羟基自由基清除能力比较($\bar{x} \pm s$)

浓度/(mg/mL)	n	AOY/%	VC/%
0.2	3	10.36 ± 0.21	18.37 ± 0.21
0.5	3	13.87 ± 0.19	20.49 ± 0.19
1	3	21.88 ± 0.20	31.30 ± 0.18
2	3	23.76 ± 0.16	55.07 ± 0.17
5	3	30.75 ± 0.18	92.78 ± 0.21
10	3	75.44 ± 0.19	99.04 ± 0.16
20	3	90.10 ± 0.19	98.94 ± 0.19
40	3	95.13 ± 0.12	99.87 ± 0.15
60	3	94.74 ± 0.20	99.29 ± 0.21
80	3	98.73 ± 0.21	99.97 ± 0.06

3.3.4 益智醇提物对超氧阴离子清除能力

邻苯三酚在碱性条件下可发生自氧化反应并释放超氧阴离子($\cdot O_2^-$), 生成的中间产物有色且该中间产物在 325 nm 波长处有较强吸收。益智醇提物在 0.2 ~ 80 mg/mL 范围内, 随着浓度的升高超氧阴离子的清除能力增强, 当浓度为 80 mg/mL 时, 清除能力达 90.6%, 从趋势看可接近 VC 水平, $IC_{50} = 15.21$ mg/mL。结果见表 6。

3.4 各组小鼠糖偏好实验(SPT)结果比较

造模后, CUMS 组小鼠糖水偏好指数明显低于 Control 组 ($P < 0.01$); 与 CUMS 组比较, CUMS-FLU 组、CUMS-AOY I 组和 CUMS-AOY II 组的糖水偏

好指数显著升高 ($P < 0.01, P < 0.05$)。结果提示, 氟西汀和 AOY 高、低剂量均能缓解抑郁模型小鼠的抑郁症状。结果见表 7。

表 6 不同浓度 AOY 超氧阴离子清除能力比较($\bar{x} \pm s$)

浓度/(mg/mL)	n	AOY/%	VC/%
0.2	3	24.92 ± 0.29	40.62 ± 0.30
0.5	3	28.43 ± 0.30	44.13 ± 0.32
1	3	34.09 ± 0.22	82.20 ± 0.30
2	3	36.93 ± 0.30	95.41 ± 0.43
5	3	42.04 ± 0.33	96.14 ± 0.33
10	3	44.12 ± 0.25	97.62 ± 0.30
20	3	55.21 ± 0.24	99.13 ± 0.33
40	3	69.80 ± 0.30	98.60 ± 0.29
60	3	80.65 ± 0.34	98.87 ± 0.25
80	3	90.60 ± 0.29	99.23 ± 0.33

表 7 各组小鼠糖水偏好指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	糖水偏好指数/%
Control 组	8	60.77 ± 6.60
CUMS 组	8	45.69 ± 7.32 ^{##}
CUMS-FLU 组	8	59.48 ± 6.92 ^{**}
Control-AOY 组	8	58.61 ± 6.80
CUMS-AOY I 组	8	56.78 ± 5.76 [*]
CUMS-AOY II 组	8	59.37 ± 6.27 ^{**}

注: 与 Control 组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与 CUMS 组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

3.5 各组小鼠强迫游泳实验(FST)结果比较

造模后, 与 Control 组比较, CUMS 组小鼠 FST 比较静止时间显著增加 ($P < 0.01$); 与 CUMS 组比较, CUMS-FLU 组和 CUMS-AOY I 组和 CUMS-AOY II 组小鼠 FST 静止时间显著减少 ($P < 0.01, P < 0.05$)。结果提示, 氟西汀和 AOY 高、低剂量均能缓解抑郁模型小鼠的抑郁症状。结果见表 8。

表 8 各组小鼠 FST 静止时间比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FST 静止时间/s
Control 组	8	87.17 ± 11.15
CUMS 组	8	116.7 ± 8.88 ^{##}
CUMS-FLU 组	8	102.4 ± 6.10 ^{**}
Control-AOY 组	8	85.24 ± 1.53
CUMS-AOY I 组	8	104.7 ± 8.47 [*]
CUMS-AOY II 组	8	100.6 ± 8.17 ^{**}

注: 与 Control 组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与 CUMS 组比较, ^{*} $P < 0.01$, ^{**} $P < 0.01$ 。

3.6 各组小鼠悬尾实验(TST)结果比较

造模后, 与 Control 组比较, CUMS 组小鼠 TST 静止时间显著增加 ($P < 0.01$); 与 CUMS 组比较, CUMS-FLU 组和 CUMS-AOY I 组和 CUMS-AOY II 组小鼠 TST 静止时间显著减少 ($P < 0.01, P < 0.05$)。结果提

示,氟西汀和AOY高低剂量均能缓解抑郁模型小鼠的抑郁症状。结果见表9。

表9 各组小鼠TST静止时间比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TST静止时间/s
Control组	8	97.58 ± 7.80
CUMS组	8	123.40 ± 8.55 ^{##}
CUMS-FLU组	8	109.50 ± 6.94 ^{**}
Control-AOY组	8	106.90 ± 5.70
CUMS-AOY I组	8	109.90 ± 5.09 [*]
CUMS-AOY II组	8	112.00 ± 6.84 [*]

注:与Control组比较,^{##} $P < 0.01$;与CUMS组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

3.7 各组小鼠海马中SOD、GSH-Px、iNOS、COX-2、NF-κB、NLRP3和IL-1β水平比较

与Control组比较,CUMS组小鼠海马中SOD和GSH-Px的活力显著降低($P < 0.01$);与CUMS组比较,CUMS-FLU组和CUMS-AOY I组和CUMS-AOY II组小鼠海马中SOD的活力显著升高($P < 0.01$),GSH-Px变化趋势与SOD相似($P < 0.01$)。这说明氟西汀和AOY能通过增强模型组小鼠海马当中的SOD和GSH-Px的活力来缓解CUMS小鼠的抑郁症状。Control-AOY组中SOD和GSH-Px的活力值虽然较Control组的活力值低,但是没有统计学意义,这说明AOY不会对空白组小鼠的SOD和GSH-Px的活力产生显著性影响。结果见表10。

表10 小鼠海马中的SOD和GSH-Px活力比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD/(U/mg protein)	GSH-Px/(U/mg protein)
Control组	8	25.07 ± 0.06	151.28 ± 4.07
CUMS组	8	24.04 ± 0.16 ^{##}	134.84 ± 6.61 ^{##}
CUMS-FLU组	8	24.94 ± 0.17 ^{**}	147.37 ± 3.57 ^{**}
Control-AOY组	8	24.94 ± 0.11	145.94 ± 3.60
CUMS-AOY I组	8	24.66 ± 0.32 ^{**}	145.36 ± 4.34 ^{**}
CUMS-AOY II组	8	25.00 ± 0.10 ^{**}	147.33 ± 2.85 ^{**}

注:与Control组比较,^{##} $P < 0.01$;与CUMS组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

表12 各组小鼠海马中NF-κB、NLRP3和IL-1β蛋白表达情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF-κB/(pg/mL)	NLRP3/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)
Control组	8	215.70 ± 1.30	166.40 ± 1.40	51.07 ± 1.09
CUMS组	8	310.60 ± 1.73 ^{##}	318.70 ± 1.71 ^{##}	74.45 ± 1.07 ^{##}
CUMS-FLU组	8	290.50 ± 1.36 ^{**}	191.40 ± 1.81 ^{**}	57.57 ± 1.18 ^{**}
Control-AOY组	8	243.60 ± 1.61	195.50 ± 1.53	55.72 ± 1.61
CUMS-AOY I组	8	296.50 ± 1.86 [*]	192.60 ± 1.65 ^{**}	60.92 ± 1.60 [*]
CUMS-AOY II组	8	259.50 ± 1.23 ^{**}	252.30 ± 1.70 ^{**}	52.08 ± 1.12 ^{**}

注:与Control组比较,^{##} $P < 0.01$;与CUMS组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

4 讨论

炎症发生、氧化应激都是抑郁发病的风险因素,会引发或加重抑郁病变。研究表明,抑郁症患者常伴促炎

与Control组比较,CUMS组小鼠iNOS含量显著升高($P < 0.01$);与CUMS组比较,CUMS-FLU组和CUMS-AOY I组和CUMS-AOY II组小鼠iNOS含量显著降低($P < 0.05$)。与Control组比较,CUMS组小鼠COX-2含量显著增加($P < 0.01$);与CUMS组比较,CUMS-FLU组和CUMS-AOY I组和CUMS-AOY II组小鼠COX-2含量显著减少($P < 0.01$, $P < 0.05$)。Control-AOY组小鼠海马中iNOS与COX-2的含量与Control组比较无统计学意义。结果见表11。

表11 各组小鼠海马中iNOS和COX-2蛋白表达情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	iNOS/(U/mL)	COX-2/(U/L)
Control组	8	1.17 ± 0.42	16.73 ± 1.43
CUMS组	8	1.83 ± 0.17 ^{##}	25.28 ± 2.48 ^{##}
CUMS-FLU组	8	1.42 ± 0.22 [*]	16.96 ± 2.40 ^{**}
Control-AOY组	8	1.27 ± 0.11	17.65 ± 1.74
CUMS-AOY I组	8	1.43 ± 0.19 [*]	22.11 ± 1.48 [*]
CUMS-AOY II组	8	1.46 ± 0.22 [*]	21.14 ± 1.66 ^{**}

注:与Control组比较,^{##} $P < 0.01$;与CUMS组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

与Control组比较,CUMS组小鼠NF-κB含量显著升高($P < 0.01$);与CUMS组比较,CUMS-FLU组和CUMS-AOY I组和CUMS-AOY II组小鼠NF-κB含量显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与Control组比较,CUMS组小鼠NLRP3含量显著升高($P < 0.01$);与CUMS组比较,CUMS-FLU组和CUMS-AOY I组和CUMS-AOY II组小鼠NLRP3含量显著降低($P < 0.01$)。与Control组比较,CUMS组小鼠IL-1β含量显著升高($P < 0.01$);与CUMS组比较,CUMS-FLU组含量和CUMS-AOY I组和CUMS-AOY II组小鼠IL-1β含量显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与空白组比较,Control-AOY组小鼠海马中NF-κB、NLRP3和IL-1β的含量无统计学意义。结果见表12。

细胞因子水平的升高,如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、IL-1β和IL-6等^[13],类风湿关节炎等与炎症相关性疾病常与抑郁症共病^[14]。抗

抑郁药能够在一定程度上降低抑郁症患者的炎症标志物水平,非甾体抗炎药等抗炎药物也被发现具有一定抗抑郁作用^[15-16]。神经炎症和脑内的氧化应激发生与人的生理和病理现象有密切的关系,能够导致脑内神经元的损伤,以及一系列危及人体的不良危害。大量研究显示,氧化应激损伤与多种疾病如神经退行性疾病、高血压、肿瘤、糖尿病等密切相关,也参与了抑郁症的发生和发展^[17]。自由基是呼吸链的重要产物之一,可以通过攻击DNA碱基、蛋白质以及膜脂质诱导细胞产生过氧化反应,从而引起细胞损伤。通常,自由基可通过机体自身的抗氧化应激系统将其清除,包括SOD、GSH-Px和CAT等,但当自由基水平超过机体清除能力时,机体负荷过大产生脂质过氧化损伤,干扰细胞正常功能,参与抑郁症的发生。本实验通过小鼠耳肿胀实验、小鼠棉球肉芽肿观察小鼠的肿胀率、肉芽肿增长情况,证明了益智醇提取物具有良好的抗炎活性;又通过考察AOY对自由基的清除能力,证明了益智醇提取物具有良好的抗氧化活性。

益智具有神经保护的作用,并且其黄酮类成分作用于BDNF靶点有一定的抗抑郁活性^[8],为了进一步研究益智的抗抑郁作用机制,本实验建立了CUMS小鼠抑郁模型,CUMS可使小鼠海马中SOD含量以及GSH-Px含量下降。谷胱甘肽(GSH)是非酶促抗氧化系统的一个重要组成部分,包括还原型(GSH)和氧化型(GS-SG)两种形式^[18]。谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶,它能催化GSH变为GSSG,使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害。GSH的变化与GSH-Px和GLR(谷胱甘肽还原酶)的酶活性相关,CUMS小鼠海马内GSH-Px降低致使GSH变为GSSG反应速率减慢,小鼠氧化态成分增加,过氧化物增加,机体产生氧化反应,进一步使机体氧化生物标志物增加,如ROS、MDA等。转录因子核因子- κ B(NF- κ B)是影响氧化应激和脑损伤相关的重要因素^[19]。ROS等氧化因子的激活导致I κ B的蛋白水解降解,伴随NF- κ B的p50和p65异源二聚体产生核易位,致使NF- κ B靶基因进行转录,产生NF- κ B^[20]。在CUMS小鼠中,SOD以及GSH-Px含量下降,诱导海马内促氧化剂-抗氧化剂平衡向促氧化剂状态转变,激活核转录因子- κ B(NF- κ B),而经氟西汀和AOY治疗后,可改善上述情况。研究表明,NF- κ B的过度激活,可导致环氧化酶-2(COX-2)的转录,并与NOS2 5'侧翼区中的

κ B元件相互作用,引发iNOS基因转录^[21-22]。COX-2的激活可能导致额外的自由基和炎症细胞因子的释放^[23],以及前列腺素的生物合成,进一步促进细胞产生炎症反应,产生炎症因子。在CUMS小鼠海马中NF- κ B受谷胱甘肽系统的影响,有明显的增加,进而诱导iNOS、COX-2含量增加,产生炎症反应,使NLRP3和IL-1 β 炎症相关因子含量增加。经氟西汀和AOY治疗后,均能产生回调的现象。本实验设立Control-AOY组,结果显示,益智提取物对于正常小鼠无显著性影响,一定程度上表明益智提取物对于动物不会产生毒性作用。

以上结果表明,AOY作用于炎症反应和氧化应激系统从而发挥抗抑郁的作用。

【参考文献】

- [1] BENASI G,FAVA G A,GUIDI. Prodromal symptoms in depression: a systematic review [J]. *Psychother Psychosom*, 2021, 90 (6) : 365-372.
- [2] YU C,ZHANG F,ZHANG L, et al. A bioinformatics approach to identifying the biomarkers and pathogenesis of major depressive disorder combined with acute myocardial infarction[J]. *Am J Transl Res*, 2023, 15(2):932-948.
- [3] 潘瑾,王堉,高志礼,等. 中医经典名方治疗抑郁症的研究进展[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24(7):2809-2816.
- [4] 陈藏器. 本草拾遗[M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 2002: 84.
- [5] 吴振宇,邢益涛,林天东,等. 益智的本草考证[J]. *中国现代中药*, 2022, 24(9): 1770-1779.
- [6] 黄璐琦,潘超美,杨全. 新编中国药材学[M]. 第6卷. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 380-384.
- [7] 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: 303-304.
- [8] YAN T, WU B, LIAO Z Z, et al. Brain-derived neurotrophic factor signaling mediates the antidepressant-like effect of the total flavonoids of alpiniae oxyphyllae fructus in chronic unpredictable mild stress mice[J]. *Phytotherapy Research*, 2016, 30(9): 1493-1502.
- [9] 权春梅. 两种芍药提取物抗氧化活性研究[J]. *山东化工*, 2022, 51(16): 14-16.
- [10] 权利娜,王露,王嘉雯,等. 多花黄精总皂苷的提取工艺及体外抗氧化研究[J]. *现代中医药*, 2022, 42(5): 47-51.
- [11] 谭曾勇,冉勤,胡琼丹,等. 绞股蓝总黄酮提取工艺及抗氧化活性研究[J]. *化学与生物工程*, 2020, 37(2): 22-27.
- [12] 胡泽香,佟雷,耿艳萌,等. 木犀草素纳米乳清除超氧阴离子研究[J]. *化工管理*, 2022, 638(23): 156-158.
- [13] GAO X, DUAN S, CAO Y, et al. Change of monocytes/macrophages in ulcerative colitis patients with symptoms of anxiety and depression[J]. *BMC Gastroenterol*, 2023, 23(1): 67.
- [14] BRENNER P, CITARELLA A, WINGARD L, et al. Use of antidepressants and benzodiazepine-related hypnotics before and after initiation of TNF- α inhibitors or non-biological systemic treatment in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis or ankylosing

- spondylitis[J]. BMC Rheumatol, 2020, 12(4):9.
- [15] WANG Y L, WU H R, ZHANG S S, et al. Catalpol ameliorates depressive-like behaviors in CUMS mice via oxidative stress-mediated NLRP3 inflammasome and neuroinflammation[J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1):353.
- [16] GUO Y, GAN X, ZHOU H, et al. Fingolimod suppressed the chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors via affecting microglial and NLRP3 inflammasome activation[J]. Life Sci, 2020, 263:118582.
- [17] HUANG T, ZHOU F, YUAN X, et al. Reactive oxygen species are involved in the development of gastric cancer and gastric cancer-related depression through ABL1-Mediated inflammation signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019:5813985.
- [18] PARK HA, ELLIS A C. Dietary antioxidants and parkinson's disease[J]. Antioxidants, 2020, 9(7):570.
- [19] PENG S J, FENG Y, LI X, et al. Thymopentin (TP-5) prevents lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and dopaminergic neuron injury by inhibiting the NF- κ B/NLRP3 signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 119:110109.
- [20] MOLDOGAZIEVA N T, MOKHOSOEVA I M, MEL'NIKOVA T I, et al. Dual character of reactive oxygen, nitrogen, and halogen species: endogenous sources, interconversions and neutralization[J]. Biochemistry (Mosc), 2020, 85(S1):S56-S78.
- [21] ROTHSCHILD D E, MCDANIEL D K, RINGEL-SCAIA V M, et al. Modulating inflammation through the negative regulation of NF- κ B signaling[J]. J Leukoc Biol, 2018, 103(6):1131-1150.
- [22] SUN W, WU Y, GAO M, et al. C-reactive protein promotes inflammation through TLR4/NF- κ B/TGF- β pathway in HL-1 cells[J]. Biosci Rep, 2019, 39(8):BSR20190888.
- [23] REGULSKA M, SZUSTER-GLUSZCZAK M, TROJAN E, et al. The emerging role of the double-edged impact of arachidonic acid-derived eicosanoids in the neuroinflammatory background of depression[J]. Curr Neuropharmacol, 2021, 19(2):278-293.

(收稿日期:2023-06-19)

Antidepressant Activity of Sharpleaf Glangal Fruit Alcohol Extract

GAN Anna, WANG Shiyu, JIN Yanjun, WU Bo, YAN Tingxu, JIA Ying[✉]

(School of Functional Food and Wine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 117004, China)

【Abstract】 Objective: To study the antidepressant activity of sharpleaf glangal fruit, *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* alcohol extract (AOY), and preliminary clarify its mechanism of action. Methods: Mouse ear swelling test and mouse cotton ball granuloma test were used to investigate the anti-inflammatory ability of AOY; the antioxidant capacity of AOY was investigated by using the antioxidant model of DPPH free radical, ABTS free radical, hydroxyl free radical and superoxide anion free radical scavenging power in vitro; a mouse model of chronic unpredictable mild stress (CUMS) was used to investigate its antidepressant activity by forced swimming test (FST), sugar preference test (SPT) and tail suspension test (TST). The action mechanism of AOY was explored by measuring the levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), nuclear transcription factor (NF- κ B), inflammatory body (NLRP3) and interleukin-1 β (IL-1 β) in the hippocampus of mice. Results: Alcohol extract of AOY inhibits acute and chronic inflammation in mice. AOY was comparable to the antioxidant level of vitamin C (VC) at a certain concentration, indicating that it has good antioxidant activity. AOY could significantly enhance the sugar preference degree of mice in the sugar preference experiment, and significantly reduce the immobile time of mice in the tail suspension experiment and the forced swimming experiment. After AOY administration, SOD and GSH-Px activities increased in the hippocampus of mice, while iNOS, COX-2, NF- κ B, NLRP3 and IL-1 β contents decreased. Conclusion: Sharpleaf glangal fruit has good anti-inflammatory and antioxidant activity, and AOY can act on both inflammatory response and oxidative stress pathways to play an antidepressant role.

【Key words】 Sharpleaf glangal fruit; Anti-inflammation; Antioxidation; Depression; Ethology