

裴海月, 姜宁, 王孟迪, 等. 槟榔对小鼠的抗抑郁作用影响及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 24-32.
Pei HY, Jiang N, Wang MD, et al. Antidepressant effect of *Areca catechu* L. on mice and its mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 24-32.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.003

槟榔对小鼠的抗抑郁作用影响及机制研究

裴海月^{1,2,3}, 姜宁⁴, 王孟迪², 王凤忠¹, 敖冬梅³, 王琼^{1,2*}

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193; 2. 西南医科大学附属中医医院中葡中医药国际合作中心/中西医结合学院, 四川 泸州 646000; 3. 北京城市学院, 北京 100094; 4. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所药理毒理研究中心, 北京 100193)

【摘要】 目的 研究槟榔对小鼠抑郁样行为的影响及其作用机制。方法 分别建立行为绝望模型和利血平拮抗模型, 雄性 ICR 小鼠分为槟榔低、中、高剂量组 (160、320、640 mg/kg) 和阳性药组 (氟西汀, 20 mg/kg), 连续灌胃给药 14 d。采用行为学检测小鼠旷场实验 (OFT)、悬尾实验 (TST) 及小鼠强迫游泳实验 (FST) 评价槟榔的抗抑郁活性; 采用利血平拮抗实验评价槟榔的抗抑郁作用和槟榔对单胺能神经系统功能的影响以及其氧化应激水平的改变。采用本课题组建立的 LC-MS/MS 分析方法测定小鼠神经递质含量; 通过超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性和丙二醛 (MDA) 含量反映槟榔抗氧化应激水平。结果 各组间体重均无显著性差异。旷场实验结果显示, 槟榔对小鼠的自发活动情况无影响。槟榔中、高剂量组可显著降低悬尾不动时间 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 低、高剂量组可明显减少小鼠在强迫游泳实验中的不动时间 ($P < 0.05$)。在利血平拮抗实验中与模型组相比, 槟榔低、高剂量组可拮抗利血平导致的小鼠体温降低 ($P < 0.01$), 且 3 个剂量组均可显著拮抗利血平引起的小鼠眼睑下垂 ($P < 0.05$)。与利血平拮抗模型组相比, 槟榔高剂量组小鼠脑组织中 5-HT 含量 ($P < 0.01$), 槟榔低、高剂量组 DA 含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 槟榔低、中剂量组 GABA 水平 ($P < 0.05$) 均有显著性升高; 槟榔中、高剂量组 5-HIAA 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。槟榔 3 个剂量组 SOD 和 CAT 活性均显著增强 ($P < 0.01$, $P < 0.01$); 槟榔中、高剂量组 MDA 含量显著下降 ($P < 0.01$)。结论 槟榔在应激类绝望模型和利血平拮抗药物模型中均表现出较好的抗抑郁疗效且未影响运动活性及体重。其抗抑郁的作用机制可能与增强脑内单胺神经能系统水平及抗氧化应激水平相关。

【关键词】 槟榔; 抑郁; 利血平; 悬尾; 强迫游泳; 神经递质; 氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0024-09

Antidepressant effect of *Areca catechu* L. on mice and its mechanism

PEI Haiyue^{1,2,3}, JIANG Ning⁴, WANG Mengdi², WANG Fengzhong¹, AO Dongmei³, WANG Qiong^{1,2*}

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China.

2. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000. 3. Beijing City College, Beijing 100094. 4. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193)

【Abstract】 **Objective** To study the effect of *Areca catechu* L. on depression-like behavior in mice and its mechanism. **Methods** Behavioral despair and reserpine antagonism models were established. Male ICR mice were divided

【基金项目】 中国农业科学院农产品加工研究所创新工程院所重点任务 (CAAS-ASTIP-2020-IFST); 泸州市高端人才引进项目 (刘新民团队); 国家重点研发计划 (2016YFE0131800)。

【作者简介】 裴海月 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药神经药理与航天医学。E-mail: 1538969289@qq.com

【通信作者】 王琼 (1975—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 食药资源神经精神调节作用研究。E-mail: luyiwangqiong@163.com

into *Areca catechu* L. low, medium and high dose groups (160, 320 and 640 mg/kg) and a positive control group (fluoxetine, 20 mg/kg). Administration was performed by continuous gavage for 14 days. The antidepressant activity of *Areca catechu* L. was evaluated by the behavioral test of open field test, tail suspension test and forced swimming test. The antidepressant effect of *Areca catechu* L. was also evaluated by the reserpine antagonism test to evaluate the effect of *Areca catechu* L. on monoaminergic nervous system functions and the change of oxidative stress level. The content of neurotransmitters in mice was determined by LC-MS/MS analysis. The anti-oxidative stress effect of *Areca catechu* L. was assessed by measuring superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and catalase (CAT). **Results** There were no significant differences in body weight between the groups. The open field test showed that *Areca catechu* L. had no effect on the locomotor activity of mice. The medium and high dose groups of *Areca catechu* L. had significantly reduced time in the tail suspension test ($P < 0.05$), and the low and high dose groups of *Areca catechu* L. had significantly reduced immobility time of mice in the forced swimming test ($P < 0.05$). In the reserpine antagonism test, compared with the model group, the low and high dose groups of *Areca catechu* L. had antagonized eyelid ptosis induced by reserpine ($P < 0.05$), and the three doses significantly antagonized the decrease of body temperature induced by reserpine ($P < 0.01$). Compared with reserpine antagonism model group, the 5-HT content in the brain tissue of mice in the *Areca catechu* L. high dose group ($P < 0.01$), DA content in *Areca catechu* L. low and high dose groups ($P < 0.01$), and the GABA level in the *Areca catechu* L. low- and medium-dose groups ($P < 0.05$) were significantly increased and the 5-HIAA level in *Areca catechu* L. medium and high dose groups was decreased significantly ($P < 0.01$). SOD and CAT levels were significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.01$) in the three dose groups of *Areca catechu* L.. MDA content was significantly decreased ($P < 0.01$) in the medium and high dose groups of *Areca catechu* L.. **Conclusions** *Areca catechu* L. has good anti-depressant efficacy in stress despair and reserpine antagonistic drug models without affecting motor activity or body weight. Its anti-depressant mechanism of action may be related to enhancement of monoamine neurogenic system levels and anti-oxidative stress effects.

[Keywords] *Areca catechu* L.; depression; reserpine; suspended tail test; forced swimming test; neurotransmitter; oxidative stress

抑郁障碍(depressive disorder)是以显著而持久的心境低落为主要特征,表现出持续的情绪低落,兴趣减退或乐趣丧失等症状的精神疾病。现代社会节奏快、压力大,使人们身心健康受到严重威胁,易出现抑郁症。WHO对抑郁症患者的统计显示,全球约3.5亿人被此症折磨,平均发病率在4.4%左右^[1],终生患病率为5.2%~16.2%^[2]。黄悦勤教授团队发表“中国抑郁障碍患病率及卫生服务利用的流行病学现况研究”最新数据显示,我国成人抑郁障碍终生患病率达6.8%,其中抑郁症患病率为3.4%^[3]。据“全球疾病负担研究”报告显示,在精神障碍类疾病中,抑郁障碍所致的疾病负担在中国乃至全球均居首位^[4]。在全球所有疾病的疾病负担中抑郁障碍排名第13位,中国处于第11位之高,可见此症给社会、家庭和个人都造成了严重心理及经济负担。

目前的抗抑郁药物疗效有限,与其出现的副作用有关^[5-6]。临床上治疗抑郁症主要以化学合成药物为主,具有治疗效果但常伴随不良反应的发生,存在抗抑郁谱窄、复发率高等缺点^[7-8],使其安全性存在隐患,临床应用具有局限性。故开发高效、低毒、机制明确的抗抑郁中药产品成为治疗抑郁症的

一大思路与方向,也将在未来成为神经精神疾病的研究热点。

四大南药之首的槟榔(*Areca catechu* L.,以下简称:ACL)作为一大常用中药,具有“杀虫消积,降气,行水,截疟”之功效^[9],在古方及现代医学中均得到广泛应用^[10]。研究显示,槟榔的提取物对抑郁症可能有治疗作用^[11],但目前尚无文献报道对槟榔抗抑郁作用开展系统研究。因此,本研究利用经典的抗抑郁药物模型及筛选方法(悬尾、强迫游泳实验、利血平拮抗实验),评价槟榔的抗抑郁作用疗效,并采用利血平拮抗模型对其作用机制(神经递质含量变化和氧化应激水平)进行初步探索,以挖掘槟榔抗抑郁作用的潜能及在神经精神领域可提供的有利价值,为开发抗抑郁新药提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级雄性ICR小鼠120只,体重18~22g(3周龄),购于北京维通利华实验动物公司[SCXK(京)2016-0011]。实验期间动物均饲养于标准环境下(室温22℃~25℃,湿度55%±5%,12h照明/12h黑暗,照明时间为:8:00 am~20:00 pm),动物

房持续保持安静无杂音。自由进食 SPF 级动物饲料及动物饮用水。实验于中国医学科学院药用植物研究所进行[SYXK(京)2017-0020],经实验动物管理与动物福利委员会审查批准(SLXD-2021052117),实验过程严格遵守 3R 原则。

小鼠根据体重进行随机分配,以确保各组间体重基线相似。每组 12 只,小鼠给药体积:20 mL/kg。适应性饲养 4 d 后开始实验,每 3 d 进行 1 次体重监测。

1.2 主要试剂与仪器

槟榔(全果超微粉,湖南口味王集团);氟西汀(盐酸氟西汀胶囊, fluoxetine hydrochloride, 法国礼来公司);羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 国药集团化学试剂有限公司);利血平注射液(reserpine, 天津金耀药业有限公司)。超氧化物歧化酶(SOD)(批号:20210811);过氧化氢酶(CAT)(批号:20210901);丙二醛(MDA)(批号:20210810),以上试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。乙腈、甲醇色谱纯(美国 Merck 公司);甲酸铵分析纯(北京化工厂);5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT, 货号:H7752);5-羟吲哚乙酸(5-hydroxy indoleacetic, 5-HIAA, 货号:H8876);多巴胺(Dopamine, DA, 货号:H8502); γ -氨基丁酸(γ amino acid butyric acid, GABA);3, 4-二羟基苯胺(DHBA, 货号:A7000),以上标准品均购自美国 Sigma 公司。

小鼠自主活动测定仪(KSME01)及小鼠自主活动实时检测分析系统,小鼠恒温游泳仪(KSQT6),小鼠悬尾仪(KSXS01)及小鼠悬尾实时检测分析系统,以上均由中国医学科学院药用植物研究所、中国航天员科研训练中心和北京康森益友科技有限公司联合研制开发;Q-Trap5500 型质谱分析仪(美国应用技术公司);电子直肠式体温计(OMRON MC-347);AL104 电子天平(上海梅特勒托利多仪器有限公司);Vibra-Cell 型超声波破碎仪(美国 Sonics 公司)。

1.3 方法

ICR 小鼠 60 只,实验共设置 5 组,每组 12 只,共 60 只。分别为空白对照组(0.5% CMC-Na)、阳性药组(氟西汀:20 mg/kg)、槟榔低、中、高 3 个剂量组(低剂量:160 mg/kg;中剂量:320 mg/kg;高剂量:640 mg/kg)。按上述方法连续给药 14 d 后进行以下 3 项行为学检测,行为学检测前 1 h 灌胃给药。具体实验流程如图 1 所示。

1.3.1 小鼠旷场实验(open field test, OFT)

利用小鼠旷场实时检测分析处理系统进行自主活动实验检测。自主活动测试箱由 4 个开放的方形测试桶组成(30 cm × 28 cm × 35 cm),利用摄像头系统对测试动物实时检测,通过软件分析处理动物运动信息。实验分为适应期和测试期。将小鼠沿壁放入测试箱适应 2 min 后,检测动物 5 min 内运动情况,评价指标包括:运动总路程、运动总时间、平均速度。

1.3.2 悬尾实验(tail suspension experiment, TST)

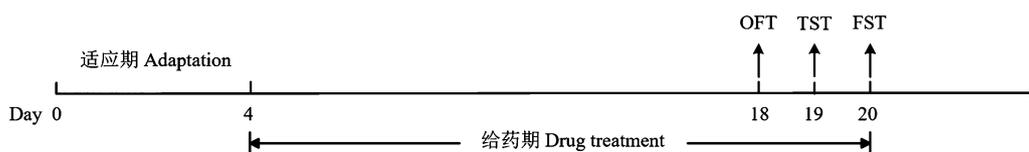
将小鼠距离尾尖部约 1 cm 处缠上胶布(约宽 6 mm,长 6~8 cm),同时挂在小鼠悬尾仪测试箱中的“S”型小铁钩上倒悬体位,其头部距箱底约 5~10 cm,测试共 6 min,前 2 min 为适应期,传感器连接系统自动统计小鼠后 4 min 内的累积不动时间。

1.3.3 小鼠强迫游泳实验(forced swimming test, FST)

将小鼠分别放入水深 15 cm 的小鼠恒温游泳仪(高 20 cm,直径 14 cm)中,水温维持在(24±1)℃。测试共 6 min,前 2 min 为适应期,系统自动记录小鼠后 4 min 内游泳累积不动时间。

1.3.4 小鼠利血平拮抗实验

ICR 小鼠 60 只,实验设置共 5 组,每组 12 只,分别为模型组(reserpine + control)、阳性对照组(reserpine+fluoxetine(20 mg/kg))、槟榔低(reserpine + ACL(160 mg/kg))、中(reserpine + ACL(320 mg/kg))、高(reserpine+ACL(640 mg/kg))3 个剂量组。



注:OFT:旷场实验;TST:悬尾实验;FST:强迫游泳实验。

图 1 实验流程和行为测试示意图

Note. OFT, Open field test. TST, Tail suspension experiment. FST, Forced swimming test.

Figure 1 Schematic representation of the experimental procedure and behavioral tests

按上述方法连续给药 14 d, 于末次给药 1 h 后, 各组腹腔注射 2 mg/kg 利血平 (reserpine, 1 mg/mL) 进行造模。评价指标: 注射利血平 1 h 后, 眼睑闭合度观测; 注射利血平 4 h 后, 体温观测。体温观测使用电子体温计 (插入肛门约 1 cm) 测量小鼠肛温。眼睑闭合度观测判断标准: 全部睁开记为 4 分, 眼闭 1/4 记为 3 分, 2/4 记为 2 分, 3/4 记为 1 分, 全闭记为 0 分^[12]。具体实验流程如图 2 所示。

1.3.5 生化指标测定

利血平拮抗实验观测指标检测后进行取材, 小鼠取血, 血浆于 4℃ 静置, 隔日离心 (3500 r/min, 10 min, 4℃), 吸取血清, 于 -80℃ 冰箱贮藏。采血后, 将小鼠处死, 在冰上迅速剥离出全脑组织, 去除小脑组织后, 按序分装于 0.5 mL 离心管放入液氮中暂存, 取材结束统一贮藏于 -80℃ 冰箱。

(1) 单胺类神经递质测定

检测前分装称重脑组织 (重量约 20~30 mg), 每个样本中加入 100 μL 超纯水, 冰浴中超声匀浆。精密吸取 50 μL 组织匀浆液置于离心管中, 加入 100 μL 乙腈溶液 (含内标 DHBA 5 μg/mL, 4℃), 涡旋混匀, 4℃ 低温离心 30 min (20000 r/min)。离心后, 小心吸取上清液依次转入样品瓶中进行 HPLC-MS 分析。制作标准曲线, 并依次计算各样本神经递质含量。

含量测定采用 TSK Gel amide 80 (2.0 mm × 150 mm, 3 μm) 色谱柱 (柱温 35℃), 流动相乙腈-15 mmol/L 甲酸铵水溶液 (pH = 5.5) (40 : 60), 流速 0.4 mL/min。质谱检测器 (Q-Trap 5500 型质谱分析仪) 以电喷雾电离方式进行离子化, 以多反应检测 (MRM) 模式进行扫描。离子源及其他相关参数优化为: TEM: 500℃; CAD: Medium; Gas1: 50 psi; Gas2: 70 psi; CUR: 20 psi。扫描方式为离子监测 (MRM) 模式, 参数: 喷雾电压 5500 V; EP: 10; CXP: 10。用于定量分析的离子为 m/z 177.0 → 160.0 (5-HT); m/z 154.2 → 136.6 (DA)^[13]。

(2) 氧化应激水平测定

取小鼠全脑组织称重后置于 1.5 mL EP 管中, 加入生理盐水 (重量 (g): 生理盐水 (mL) = 1 : 9) 制成 10% 的组织匀浆。离心 (4℃, 3000 r/min, 10 min) 取组织上清液。按照各试剂盒说明书对小鼠脑组织进行 SOD、MDA 和 CAT 含量的测定。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 使用最小显著差数法 (LSD) 多重比较方法或非参数两独立样本检验 (曼-惠特尼检验) 进行显著性分析, 数据以平均数 ± 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槟榔对小鼠体重的影响

如图 3 所示各组的体重均有稳步上升。与空白对照组相比, 槟榔给药组整体增长趋势较缓, 但各组间无显著性差异 ($P > 0.05$), 表明槟榔给药后未出现对动物的体重有统计学意义的影响。实验中观察到高剂量组小鼠排便增多, 饮食饮水量未见减少的现象, 考虑槟榔具有“消积行气”之功效, 对胃肠道消化具有促进作用。且结合参考文献报道^[14], 槟榔中的槟榔碱对远端结肠平滑肌具有收缩作用, 其促收缩作用会随槟榔碱剂量增加而增强, 从而增加胃肠蠕动和排便次数, 故此可能是造成其体重与空白组相比较呈下降趋势的原因。

2.2 槟榔对小鼠旷场实验 (OFT) 中自发活动的影响

由表 1 可知, 与空白对照组相比, 槟榔各剂量组在 OFT 的运动路程、运动时间、平均速度, 各组间均无显著性差异 ($P > 0.05$), 各组间自主活动的运动路程、运动时间、运动速度相当。表明槟榔对小鼠的自发活动无明显影响。

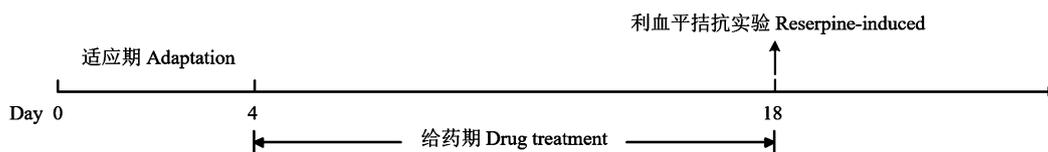


图 2 实验流程和行为测试示意图

Figure 2 Schematic representation of the experimental procedure and behavioral tests

2.3 槟榔对悬尾实验(TST)的影响

如图 4 所示,与空白对照组相比,槟榔 320 mg/kg 剂量组 TST 不动时间差异有统计学意义($P < 0.05$),槟榔 640 mg/kg 剂量组不动时间显著降低($P < 0.01$)。另阳性药氟西汀组及槟榔 160 mg/kg 剂量组不动时间降低趋势明显,但差异无统计学意义($P = 0.07, P = 0.1$)。

2.4 槟榔对小鼠强迫游泳(FST)实验的影响

如图 5 所示,与空白组相比,槟榔 160、640 mg/kg 剂量组 FST 不动时间差异有统计学意义($P < 0.05$)。槟榔 320 mg/kg 剂量组具有降低不动时间的趋势,差异无统计学意义。

2.5 槟榔对利血平拮抗实验的影响

与模型组相比(图 6A),阳性药氟西汀组、槟榔 160、640 mg/kg 剂量组可显著逆转利血平引起的肛温降低($P < 0.01$)。与模型组相比(图 6B),槟榔 160、320、640 mg/kg 3 个剂量组均可逆转利血平引起的眼睑下垂($P < 0.05$),其中槟榔 160、640 mg/kg 剂量组逆转作用显著($P < 0.01$)。

2.6 槟榔对利血平拮抗小鼠神经递质的影响

与利血平拮抗模型相比,槟榔 640 mg/kg 剂量组和阳性药氟西汀组可显著增加小鼠脑组织中 5-HT 含量($P < 0.01$)(图 7A);槟榔 160、640 mg/kg 剂量组可以显著增加小鼠脑组织中 DA 含量($P < 0.01$),槟榔 320 mg/kg 剂量组、阳性药氟西汀组可增加小鼠脑组织中 DA 含量的趋势,但结果无统计学意义(图 7C);槟榔 160、320 mg/kg 剂量组和阳性药氟西汀组可以显著增加小鼠脑组织中 GABA 水平($P < 0.05$),槟榔 640 mg/kg 剂量组具有增加小鼠脑组织中 GABA 含量的趋势,但结果无统计学意义(图 7D)。如图 7B 所示,与利血平拮抗模型比较,槟榔 320、640 mg/kg 剂量组可以显著降低小鼠脑组织中 5-HIAA 含量($P < 0.01$)。

2.7 槟榔对利血平拮抗小鼠氧化应激水平的影响

如图 8 所示,与模型组相比,槟榔 160、320、640 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 SOD 活性($P < 0.01$),CAT 活性均显著升高($P < 0.01$),槟榔 320、640 mg/kg 剂量组 MDA 含量显著减少($P < 0.01$)。

表 1 槟榔对小鼠自发活动的影响(旷场法)($n = 12, \bar{x} \pm s\bar{x}$)

Table 1 Effects of *Areca catechu* L. on spontaneous activity in mice (open field test)

	空白对照组 Control	氟西汀组 Fluoxetine	槟榔(160 mg/kg) ACL(160 mg/kg)	槟榔(320 mg/kg) ACL(320 mg/kg)	槟榔(640 mg/kg) ACL(640 mg/kg)
总路程(cm) Total distance	1662.14 ± 154.95	1552.99 ± 149.05	1445.52 ± 88.72	1379.52 ± 220.81	1393.05 ± 127.43
运动总时间(s) Time of movement	123.83 ± 8.12	118.38 ± 7.95	111.99 ± 5.76	101.75 ± 14.14	106.35 ± 8.07
平均速度(cm/s) Average velocity	7.36 ± 0.46	7.05 ± 0.45	6.68 ± 0.29	6.59 ± 0.29	7.64 ± 0.44

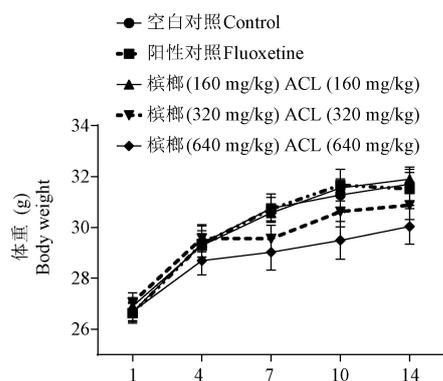
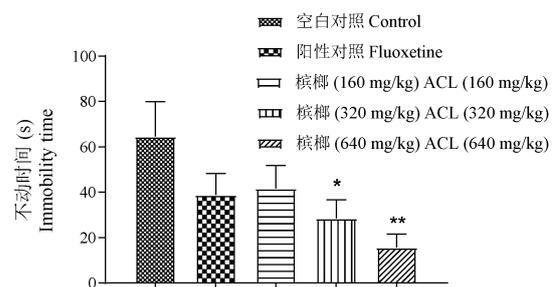


图 3 槟榔对小鼠体重的影响($n = 12, \bar{x} \pm s\bar{x}$)

Figure 3 Effects of *Areca catechu* L. on body weight of mice

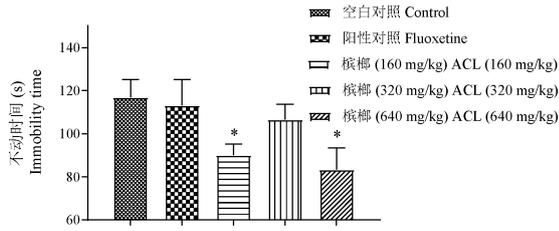


注:与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 4 槟榔连续给药 14 d 对小鼠悬尾实验不动时间的影响($n = 11 \sim 12, \bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Effects of *Areca catechu* L. on immobility time of mice in TST after 14 d continuous administration

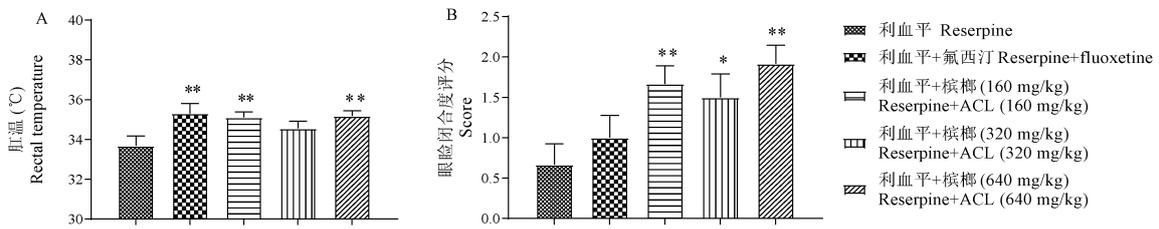


注:与空白组相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 槟榔连续给药 14 d 对小鼠强迫游泳实验不动时间的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 5 Effects of *Areca catechu* L. on immobility time of mice in FST after 14 d continuous administration

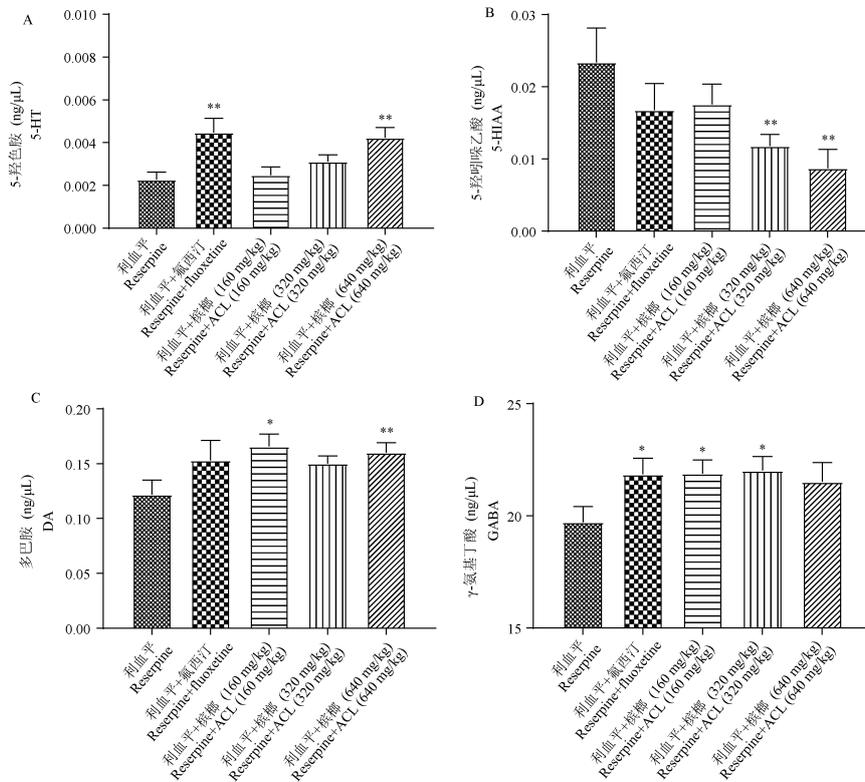


注:与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 6 槟榔对利血平拮抗所致眼睑下垂、体温降低的影响 ($n = 12, \bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Effects of *Areca catechu* L. on the reserpine-induced eye ptosis and hypothermia



注:与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

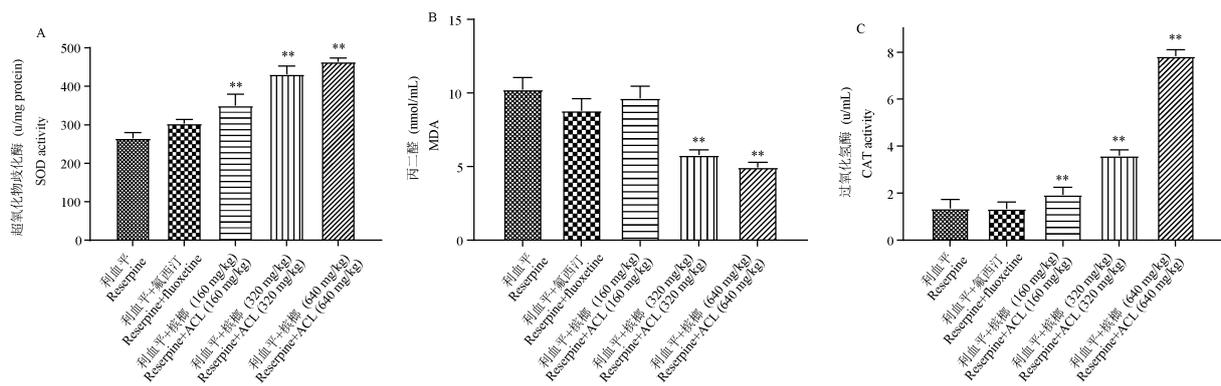
图 7 槟榔对利血平拮抗小鼠脑组织中 5-HT、5-HIAA、DA、GABA 水平的影响 ($n = 8 \sim 12, \bar{x} \pm s\bar{x}$)。

Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 7 Effects of *Areca catechu* L. on 5-HT, 5-HIAA, DA, GABA levels in brain tissue of reserpine-induced mice

3 讨论

在中医学中抑郁症属“郁证”,其是由情绪不适、气滞、气血不畅引起的综合征,与多脏器损伤、功能紊乱相关^[15]。目前已有众多中药及中药复方均显示出一定抗抑郁活性,并具良好安全性,无明显副作用,由此为中药抗抑郁的疗效及发展建立了良好基础。依据文献报道,中药槟榔具有抗抑郁的潜能^[16],复方蒙药槟榔十三味丸用于治疗“赫依”^[17],并结合本研究中针对抑郁情绪的动物行为学实验结果,均显示出了槟榔初步抗抑郁药效。因此挖掘和验证槟榔在防治抑郁症的潜能是本研究



注:与模型组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 8 槟榔对利血平拮抗小鼠脑组织氧化应激水平的影响 ($n = 8, \bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note. Compared with the model group, ** $P < 0.01$.

Figure 8 Effects of *Areca catechu* L. on the reserpine-induced oxidative stress in brain tissue of mice

的一大重要意义,继而探究其发病机制,为社会减轻疾病负担提供有力支持,为开发抗抑郁药物提供价值参考。

旷场实验(OFT)常贯穿应用于动物行为学研究中,检测与评价实验动物的自发活动行为(locomotor activity)和探索行为(exploratory behavior)。在神经学与精神药理学领域研究中可用于检测药物是否存在副作用(如对行动的影响等)。中枢兴奋药物可增加自发活动,减少探究行为,一定剂量下神经精神药物可减少探究行为,对自发活动无影响。本实验通过OFT对小鼠的自发活动进行检测,证明槟榔未对小鼠的运动活性产生影响,在各剂量下均未见中枢神经的过度兴奋或抑制,进一步得到槟榔可能不是中枢神经系统兴奋剂^[18]。伴随给药可见槟榔给药组的小鼠体重整体增长趋势相对较缓,且随剂量增加趋势愈加明显,但未达统计学意义。实验中观察可见高剂量组小鼠排便增多,饮食饮水量未见减少,考虑槟榔具有“杀虫消积,降气,行水,截疟”之功效^[9],其消积行气作用可能增强了其胃肠运动,对胃肠道消化具有促进作用。结合文献报道^[14],槟榔中的槟榔碱对远端结肠平滑肌具有收缩作用,且其促收缩作用会随槟榔碱剂量增加而增强,从而增加胃肠蠕动和排便次数,可能是造成其体重与空白组相比较呈下降趋势的原因。

两大绝望模型悬尾实验和强迫游泳实验作为经典的应激模型,均具有简便快捷的特点^[19-20]。强迫游泳实验(FST),也称Porsolt实验^[21],是研究啮齿类动物抑郁样行为最常用的方法之一^[22-23]。之

后悬尾实验以“绝望行为”启发并根据“搜寻-等待策略(searching-waiting strategy)”而建立,后也作为研究抑郁的常用分析方法^[24-25],这两种方法是利用小鼠企图但又无法逃脱,从而放弃挣扎,进入特有的抑郁不动状态的原理,对其不动时间进行统计分析评价。多用于抗抑郁药物的初步筛选,快速评价其药效,并为起效的剂量范围提供参考。Dar等^[26]报道发现槟榔在小鼠悬尾和强迫游泳实验中表现出显著抗抑郁活性。本研究中,槟榔给药后对行为绝望模型小鼠具有良好的抗抑郁作用,在TST中槟榔中、高剂量组和FST中槟榔的低、高剂量组均可明显减少不动时间,抗抑郁效果显著。

利血平拮抗模型为传统的药物诱导抑郁模型^[27],不仅在抑郁症发病机理和抗抑郁药物研究中广泛使用^[28-29]。利血平为囊泡再摄取抑制剂,其通过耗竭脑组织中单胺类神经递质(如5-HT、DA等),抑制中枢神经系统,导致实验动物产生体温降低,眼睑下垂、心率减慢等抑郁样症状。根据抑郁症的“单胺假说”理论,其认为抑郁症与脑内胺类神经递质(5-HT、DA、NE)、氨基酸类(γ 氨基丁酸)神经递质的及其受体水平异常有关^[30-31]。而抗抑郁药通过增加脑内NA和5-HT水平产生抗抑郁作用,尤其以单胺氧化酶抑制剂为例,其可不同程度拮抗利血平引起的这些行为。槟榔表现出抗抑郁活性,可能是通过大脑中5-羟色胺和去甲肾上腺素的升高所介导的^[32]。本实验中槟榔从观测指标(肛温、眼睑闭合度)和神经递质浓度水平的结果中均表现出明显的抗抑郁作用,证实了既往文献中对槟榔具

抗抑郁作用的猜测。并有研究报道,槟榔发挥抗抑郁作用的机制可能与 A 型单胺氧化酶(MAO)抑制剂吗氯贝胺(moclobemide)相似^[33],通过抑制单胺氧化酶同工酶 A(MAO-A)的活性^[34],提高神经系统内单胺含量,发挥抗抑郁作用。

氧化应激(oxidative stress, OS)已被明确证实其参与抑郁症的发病机制及病理过程^[35]。抑郁症发作与体内氧化应激水平增加及内源性抗氧化物质的浓度降低有关^[36]。抑郁症患者会出现内源性抗氧化物质水平下降,伴随包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等的活性降低。SOD 活性降低会引起自由基及活性氧(ROS)在体内蓄积,当抗氧化与氧化能力间的动态平衡被破坏,机体内活性氧自由基异常活跃,产生大量自由基而过度氧化,会导致脑组织脂质过氧化损伤,从而引起脂质过氧化产物堆积,如丙二醛(MDA)含量的增加。本研究中连续给予 14 d 槟榔的小鼠可明显升高 SOD、CAT 活性及下调 MDA 表达量,表明了槟榔在利血平致抑郁模型下具有良好的抗氧化应激的作用。

对于行为学实验结果显示,槟榔均有一定的抗抑郁疗效,其中槟榔中、高剂量对 TST,低、高剂量对 FST 和利血平拮抗实验中肛温均表现出显著的抗抑郁作用,低、中、高 3 个剂量对利血平拮抗实验的体温变化均有调节作用。其抗抑郁作用及机制指标结果虽不是每个指标均出现剂量效应递增或递减关系,但总体结果趋势有效,后期可以通过扩大动物样本量进行进一步证实。

综上所述,本实验通过采用两种经典可靠的应激类模型和一种药物诱导致抑郁模型,通过行为学指标分析其抗抑郁活性,后利用利血平拮抗实验对其脑组织中的神经递质和氧化应激的变化进行一系列的行为学验证和机制探索,并基于已有文献报道,证明了槟榔具有抗抑郁的活性及疗效,其抗抑郁的作用机制可能与增强脑内单胺神经能系统水平相关,并对氧化应激水平具有调控作用,具有可逆氧化,校正脑内自由基系统失衡的能力。

参考文献:

[1] Malhi GS, Mann JJ. Depression [J]. Lancet, 2018, 392(10161): 2299-2312.
[2] Bland RC. Epidemiology of affective disorder: a review [J]. Can

J Psychiat, 2019, 42: 367-377.
[3] Lu J, Xu X, Huang Y, et al. Prevalence of depressive disorders and treatment in China: a cross-sectional epidemiological study [J]. Lancet Psychiat, 2021, 8(11): 981-990.
[4] GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. Lancet, 2020, 396(10258): 1204-1222.
[5] Lam RW, Kennedy SH. Evidence-based strategies for achieving and sustaining full remission in depression: focus on metaanalyses [J]. Can J Psychiat, 2004, 49(3 Suppl 1): 17-26.
[6] Dording CM, Mischoulon D, Petersen TJ, et al. The pharmacologic management of SSRI-induced side effects: a survey of psychiatrists [J]. Ann Clin Psychiat, 2002, 14(3): 143-147.
[7] Du Y, Li W, Li Y, et al. Repeated arctigenin treatment produces antidepressant-and anxiolytic-like effects in mice [J]. Brain Res Bull, 2019, 146: 79-86.
[8] Jiang N, Lv JW, Wang HX, et al. Dammarane sapogenins alleviates depression-like behaviours induced by chronic social defeat stress in mice through the promotion of the BDNF signalling pathway and neurogenesis in the hippocampus [J]. Brain Res Bull, 2019, 153: 239-249.
[9] 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.
[10] Peng W, Liu YJ, Wu N, et al. *Areca catechu* L. (Arecaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 164: 340-356.
[11] Chu NS. Effects of Betel chewing on the central and autonomic nervous systems [J]. J Biomed Sci, 2001, 8(3): 229-236.
[12] Bourin M, Poncelet M, Chermat R, et al. The value of the reserpine test in psychopharmacology [J]. Arzneimittelforschung, 1983, 33(8): 1173-1176.
[13] Wang LS, Zhang MD, Tao X, et al. LC-MS/MS-based quantification of tryptophan metabolites and neurotransmitters in the serum and brain of mice [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1112: 24-32.
[14] Li CB, Yang X, Tang WB, et al. Arecoline excites the contraction of distal colonic smooth muscle strips in rats via the M3 receptor-extracellular Ca²⁺ influx-Ca²⁺ store release pathway [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(4): 439-447.
[15] 姜晓梅, 金永新, 向蓉, 等. 抑郁症的中医药治疗研究现状 [J]. 甘肃医药, 2017, 36(9): 728-730.
[16] 栾剑, 陶晓月. 关于传统中药槟榔生物活性的研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2018, 24(13): 8-12.
[17] 李杰. 蒙药槟榔十三味丸抗抑郁作用和改善抑郁综合症状的物质作用基础及机理 [J]. 中国民族医药杂志, 2016, 22(2): 47-52.
[18] Bende MM, Dudhgaonkar S, Jagdhani RS, et al. The

- antidepressant like action of ethanolic extract of *Areca catechu* on behavioral models of depression in rats [J]. Int J Basic Clin Pharmacol, 2016, 5(5): 2098-2102.
- [19] 薛涛, 邬丽莎, 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): 321-326.
- [20] 姜宁, 张亦文, 刘新民, 等. 大小鼠抑郁行为实验方法概述 [EB/OL]. (2021-12-1) [2022-01-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2986.Q.202111130.1227.012.html>.
- [21] Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments [J]. Nature, 1977, 266(5604): 730-732.
- [22] Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants [J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1977, 229(2): 327-336.
- [23] Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, et al. The forced swim test as a model of depressive-like behavior [J]. J Vis Exp, 2015, 97: 52587.
- [24] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice [J]. Psychopharmacology, 1985, 85: 367-370.
- [25] Steru L, Thierry B, Chermat R, et al. Animal modeling of depression: an ethological approach and its relevance to psychopharmacology [A]. Presented at the 13th CINP Congress [C]. Jerusalem: CINP Congress; 1982.
- [26] Dar A, Khatoon S, Rahamn G, et al. Antidepressant activities of *Areca catechu* fruit extracts [J]. Phytomedicine, 1997, 4(1): 41.
- [27] 宗阳, 朱立静, 孙冰婷, 等. 利血平诱导的抑郁模型的研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(19): 2697-2699.
- [28] Askew BM. A simple screening procedure for imipramine-like antidepressant agents [J]. Life Sci, 1963, 2(10): 725-730.
- [29] Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder [J]. New Engl J Med, 2008, 358(1): 55-68.
- [30] Hirschfeld RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression [J]. J Clin Psychiatry, 2000, 61(Suppl 6): 4-6.
- [31] López-Muñoz F, Alamo C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(14): 1563-1586.
- [32] Abbas G, Naqvi S, Erum S, et al. Potential antidepressant activity of *Areca catechu* nut via elevation of serotonin and noradrenaline in the hippocampus of rats [J]. Phytother Res, 2013, 27(1): 39-45.
- [33] Dar A, Khatoon S. Behavioral and biochemical studies of dichloromethane fraction from the *Areca catechu* nut [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2000, 65(1): 1-6.
- [34] 何嘉泳, 陈杰桃, 辛志添, 等. 槟榔壳总酚类提取物抗抑郁作用研究 [J]. 中国药师, 2012, 15(8): 1076-1078.
- [35] Shvetank B, Anantha NN, Chandragouda RP. Role of oxidative stress in depression Author links open overlay panel [J]. Drug Discov Today, 2020, 25(7): 1270-1276.
- [36] 赵约翰. 银杏叶提取物 EGb761 改善脂多糖诱导的小鼠抑郁样行为及其机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2015.

[收稿日期]2021-11-25