但由于治疗时间仅 21 天,尚不能按照 ITP 疗效评定标准判定疗效。同时,本研究中 T 细胞及其亚群以及血小板相关抗体观察结果尚不能提供健脾益气摄血颗粒具有明确调节免疫功能相关证据,有待于进一步开展临床或基础实验进行弥补或辅助说明。

参考文献

- 1 张之南. 血液病的诊断及治疗标准[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 172 - 176
- 2 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 北京科学技术出版社, 2007: 134 - 135
- 3 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 207 - 224
- 4 李天天, 褚雨霆, 杨璐, 等. 脾主统血理论的内涵与拓展[J]. 中医药信息, 2015, 32(6): 99 - 102
- 5 陈锐. 免疫性血小板减少性紫癜临床路径(2010年版)[J]. 中国社区医师, 2011, 27(11): 17
- 6 吴意红, 彭剑虹, 陈婉荷, 等. 归脾丸对慢性特发性血小板减少性紫癜患者血小板相关抗体影响的研究[J]. 现代中医药, 2011, 31(3): 1 - 3
- 7 李鑫, 王芳, 丁凯阳, 等. 调节性 B 细胞在免疫性血小板减少症发病过程中的意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(2): 403 - 406
- 8 Andreia M, Cláudia S, Gifone AR, et al. The levels of IL - 17A and of the cytokines involved in Th17 cell commitment are increased in patients with chronic immune thrombocytopenia [J]. Haematologica,

- 2011, 96(10): 1560 - 1562
- 9 Zahran AM, Elsayh KI. CD4⁺ CD25⁺ HighFoxP3⁺ regulatory T cells, B lymphocytes, and T lymphocytes in patients with acute ITP in Assiut Children Hospital [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2014, 20(1): 61 - 67
- 10 Bao W, Bussel JB, Heck S, et al. Improved regulatory T - cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents [J]. Blood, 2010, 116 (22): 4639 - 4645
- 11 张蓝方, 郝云良. CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞和 Th17 细胞在特发性血小板减少性紫癜中的表达和意义 [J]. 临床医学, 2011, 31(9): 1 - 4
- 12 Arandi N, Mirshafiey A, Jeddi - Tehrani M, et al. Alteration in frequency and function of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2014, 13(2): 85 - 92
- 13 吴晓勇, 李冬云, 陈信义, 等. 益髓颗粒对 ITP 小鼠脾脏 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞及其相关因子影响的研究 [J]. 当代医学, 2010, 14: 1 - 3
- 14 何牧卿, 何牧群, 郭文坚. 升血小板胶囊对免疫性血小板减少性紫癜 CD⁺ 4CD⁺ 25Treg 细胞的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(2): 422 - 425
- 15 Sakakur AM, Wad AH, Tawar AI, et al. Reduced CD4⁺ CD25⁺ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Thromb Res, 2007, 120(2): 187 - 193

(收稿日期: 2018 - 08 - 30)

(修回日期: 2019 - 03 - 12)

柴胡白芍提取液对小鼠抑郁样行为的影响

张 蕾 牟翔宇 孙 鹏 于 洋 郜彦鑫 郭英慧

摘要 **目的** 观察柴胡与白芍提取液合用对小鼠的抑郁样行为是否具有改善作用, 以为研发抗抑郁新药提供实验支持。**方法** 将 150 只雄性 C57BL/6 小鼠均分为旷场实验(open field test, OFT)、悬尾实验(forced swimming test, FST)和强迫游泳实验(tail suspension test, TST)3 个实验, 每个实验设计 50 只小鼠, 每个实验设计分别分为 5 组, 空白对照(control)组、氟西汀组、柴芍高剂量组、柴芍中剂量组、柴芍低剂量组, 分别灌胃, 给药 7 天后进行旷场实验, 强迫游泳实验和悬尾实验, 检测柴胡白芍提取液对小鼠抑郁样行为的影响。**结果** 旷场实验中, 柴芍高剂量组与柴芍低剂量组对比空白组差异无统计学意义, 而柴芍中剂量组与氟西汀组可明显增加小鼠的中央区停留时间($P < 0.05$)。悬尾实验中, 柴芍高、中、低剂量组对比空白组可明显缩短小鼠悬尾不动时间($P < 0.05$)。强迫游泳实验中, 柴芍高、中、低剂量组对比空白组可明显缩短小鼠游泳不动时间($P < 0.05$)。**结论** 柴胡白芍提取液合用对小鼠抑郁样行为具有较为明显的改善作用, 但其具体作用机制有待于进一步研究。

关键词 柴胡 白芍 抑郁样行为 小鼠 影响

中图分类号 R285.5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.09.012

Effects of Radix Bupleuri and Radix Paeoniae Alba Extracts on Depressive Behavior in Mice. Zhang Lei, Mou Xiangyu, Sun Peng, et al.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202616)

作者单位: 250355 济南, 山东中医药大学

通讯作者: 郭英慧, 副教授, 硕士生导师, 电子信箱: yhguo76@126.com

Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong 250355, China

Abstract Objective To observe whether the combination of Radix Bupleuri and Radix Paeoniae Alba extracts can improve the depression-like behavior in mice, and provide experimental support for the development of new antidepressant drugs. **Methods** Totally 150 male C57BL/6 mice were divided into three experiments: open field test (OFT), forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST). Each experiment was designed with 50 mice and divided into five groups, the blank control (control) group, fluoxetine group, Bupleurum and Radix Paeoniae high dose group, Bupleurum and Radix Paeoniae middle dose group, Bupleurum and Radix Paeoniae low dose group, respectively. Behavioral tests were performed after seven day's administration. The open field experiment, forced swimming test and tail suspension experiment were carried out to test the effect of the extract of Bupleurum chinense on the depression like behavior of mice. **Results** In the open field experiment, there was no significant difference between the high dose group and the low dose group of Bupleurum and Radix Paeoniae compared with the blank group, while the middle dose group and the fluoxetine group significantly increased the retention time in the central area ($P < 0.05$). In the tail suspension experiment, the high, medium and low dose groups of Bupleurum and Radix Paeoniae could significantly shorten the time of mouse tail suspension in this blank group ($P < 0.05$). In the forced swimming experiment, the high, medium and low dose groups of Bupleurum and Radix Paeoniae could significantly shorten the swimming time ($P < 0.05$). **Conclusion** The combination of Bupleurum chinense extract has a significant improvement effect on depression like behavior in mice, but its specific mechanism needs further study.

Key words Bupleurum; Radix paeoniae alba; Depressive behavior; Mice; Effect

柴胡的基本功效是疏肝解郁, 升举阳气, 透表泄热, 在众多抗抑郁复方中, 柴胡类方占有重要地位, 约占总数的 $1/3$ ^[1]。众多实验表明, 逍遥散、四逆散、柴胡疏肝散、安神解郁汤等在调节抑郁样情绪方面有显著效果, 归纳看来, 此类方剂均以柴胡为君药, 疏肝解郁, 和解表里, 以白芍为臣药, 养血柔肝, 敛阴收汗, 二者配伍使用一散一收, 相互展其长而避其短^[2,3]。现代药理研究表明, 这些方剂中主要起效物质为柴胡皂苷和芍药苷^[4]。柴胡皂苷是柴胡中最主要的活性成分, 具有抗肝纤维化、抗病毒、保护肝细胞、抗肿瘤、抗炎、免疫的作用^[5]。芍药的主要活性成分为芍药苷, 芍药苷对抗伤害性疼痛、免疫、抵抗炎症等方面具有积极的作用^[6]。虽然柴胡与白芍常配对出现在抗抑郁的处方中, 但鲜有关于二者有效成分单独配伍使用, 对小鼠抑郁样行为影响的报道, 故本研究将就此进行探讨。

材料与方法

1. 实验材料: SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠, 体质量 $18 \sim 22\text{g}$, 150 只, 日龄 $21 \sim 27$ 天。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK(京)2016-0006。采用按体重匀齐分组的方法将 150 只 C57BL/6 雄性小鼠分为 3 个组, 即旷场实验、悬尾实验和强迫游泳实验组, 再将 3 个实验组分别分为 5 组, 即空白对照(control)组、氟西汀组、柴芍高剂量组、柴芍中剂量组和柴芍低剂量组, 每组 10 只, 5 只一笼分笼饲养。小鼠于实验室进行适应性饲养 1 周, 保持 $12\text{h}/12\text{h}$ 明暗周期, 昼夜颠倒, 常规喂食

喂水。所有动物实验操作遵从于美国 NIH 颁布《实验动物护理和使用指南》。适应性饲养结束后, 小鼠按照药量体质量比 $0.1\text{ml}/10\text{g}$ 标准开始灌胃给药, 阳性对照组灌胃氟西汀药液。柴胡白芍(以下简称柴芍)高、中、低剂量组, 空白对照组给予同等量的载体溶剂。

2. 试剂与仪器: 柴胡提取液、白芍提取液均由山东中医药大学实验中心药剂实验室提供。柴胡、白芍按 $12:10$ 的生药用量配伍(出自柴胡疏肝散)再通过人和小鼠的体表面积换算, 计算出柴芍提取液低剂量组的浓度, 依次进行两倍的换算推出高、中两个剂量, 最后得出柴胡、白芍按 $1.00\text{g}/\text{kg}:0.80\text{g}/\text{kg}:0.50\text{g}/\text{kg}:0.40\text{g}/\text{kg}:0.25\text{g}/\text{kg}:0.20\text{g}/\text{kg}$ 3 个高、中、低比例配伍, 再分别回流提取 2 次 10 倍量的 70% 乙醇, 每次提取 1.5h, 合并 2 次提取液, 过滤除去药渣, 滤液减压回收乙醇, 并将提取液放于 4°C 冰箱保存^[7,8]。氟西汀分散片购自礼来苏州制药有限公司, 批号: L01810, 给药时浓度为 $2\text{mg}/\text{kg}$; Smart 3.0.0.5 动物行为学分析系统、XR-SuperMaze 动物行为分析系统、XR-XZ301 旷场实验系统、小鼠悬尾实验箱体、小鼠强迫游泳装置等均购自上海欣软信息科技有限公司。

3. 小鼠旷场实验: 小鼠旷场实验在灌胃第 8 天进行测试。测试当天, 各组小鼠均在用药后 0.5h 进行实验, 轻抓握小鼠颈背部皮肤, 放置于旷场箱的中央区域, 待手完全不在视频范围中时, 操作软件开始记录分析, 每只小鼠采集时间为 6min, 由计算机记录小

鼠的运动轨迹,并分析中央区滞留时间(s)。

4. 小鼠悬尾实验:小鼠悬尾实验在灌胃第8天进行测试。通过固定小鼠的尾部,使小鼠头部向下,记录处于该绝望状态中小鼠产生的一系列不动参数。测试当天,各组小鼠均在用药后0.5h进行实验,小鼠尾端(在距尾尖2cm处)用胶带固定在悬尾箱的中间横杆上,使其呈倒悬状态,头部离悬尾箱底部约15cm。适应2min后,利用软件分析记录4min之内,累计不动时间(s)。

5. 小鼠强迫游泳实验:小鼠强迫游泳实验在灌胃第8天进行测试。测试前1天小鼠放入高20cm、直径10cm的圆柱型小鼠强迫游泳桶中适应性游泳5min,测试当天,给药0.5h后将小鼠放入游泳桶中,每桶1只,水深10cm,水温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,利用软件分析记录小鼠6min内的悬浮不动时间、悬浮不动潜伏期及悬浮不动次数。

6. 统计学方法:数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用GraphpadPrism 6.0软件做方差分析及t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 柴芍提取液对小鼠旷场中央区停留时间的影响:柴芍高剂量组和柴芍低剂量组相比空白对照组,差异无统计学意义,而柴芍中剂量组和氟西汀组可明显增加小鼠在中央区停留时间($P < 0.05$),改善其抑郁样行为。中剂量组柴胡白芍提取液可以明显改善小鼠抑郁样行为,增加OFT实验中小鼠的中央区停留时间,详见表1。

表1 柴胡白芍提取液对小鼠中央区停留时间的影响
($\bar{x} \pm s$) (C57BL/6 小鼠)

组别	n	剂量(g/kg)	中央区停留时间(s)
空白对照组	10	0	2.598 $\pm$ 1.090
柴芍高剂量组	10	0.75,0.60	5.171 $\pm$ 1.107
柴芍中剂量组	10	0.50,0.40	7.753 $\pm$ 1.846*
柴芍低剂量组	10	0.25,0.20	2.383 $\pm$ 1.221
氟西汀组	10	0.002	8.606 $\pm$ 2.196*

与空白对照组比较,* $P < 0.05$

2. 柴胡白芍提取液对小鼠悬尾的影响:柴芍高、中、低剂量组和氟西汀组对比空白组可缩短小鼠悬尾不动时间($P < 0.05$),上述剂量柴胡白芍提取液可显著改善C57BL/6小鼠的抑郁样行为,其中以氟西汀组和柴芍高剂量组效果更好,从而说明柴胡白芍提取液有改善小鼠抑郁样行为的作用,详见表2。

表2 柴胡白芍提取液对小鼠悬尾不动时间的影响
($\bar{x} \pm s$) (C57BL/6 小鼠)

组别	n	剂量(g/kg)	不动时间(s)
空白对照组	10	0	186.500 $\pm$ 9.971
柴芍高剂量组	10	0.75,0.60	119.6 $\pm$ 14.3**
柴芍中剂量组	10	0.50,0.40	128.0 $\pm$ 14.3*
柴芍低剂量组	10	0.25,0.20	136.800 $\pm$ 8.505*
氟西汀组	10	0.002	104.80 $\pm$ 13.82**

与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3. 柴胡白芍提取液对小鼠强迫游泳不动时间的影响:柴芍高、中、低剂量组和氟西汀组对比空白对照组,可明显缩短小鼠强迫游泳不动时间($P < 0.05$),上述剂量柴胡白芍提取液可显著改善C57BL/6小鼠的抑郁样行为,其中以氟西汀组和柴芍低剂量组效果更好,从而说明柴胡白芍提取液有改善小鼠抑郁样行为的作用,详见表3。

表3 柴胡白芍提取液对小鼠强迫游泳不动时间的影响
($\bar{x} \pm s$) (C57BL/6 小鼠)

组别	n	剂量(g/kg)	不动时间(s)
空白对照组	10	0	179.80 $\pm$ 30.30
柴芍高剂量组	10	0.75,0.60	74.70 $\pm$ 21.84*
柴芍中剂量组	10	0.50,0.40	69.55 $\pm$ 26.78**
柴芍低剂量组	10	0.25,0.20	66.23 $\pm$ 19.38**
氟西汀组	10	0.002	48.93 $\pm$ 21.08**

与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

讨 论

杨洁等^[9]通过对比柴胡加龙骨牡蛎汤组、单味柴胡组、小柴胡类方组(去柴胡)、非小柴胡组(桂枝、茯苓、大黄、龙骨、牡蛎)发现,虽柴胡组、非小柴胡组都能明显缩短小鼠悬尾不动时间,增加5-HT诱导小鼠甩头次数,但仍以全方柴胡加龙骨牡蛎汤的抗抑郁作用更好。于春泉等^[8]通过对比柴芍高、中、低剂量组,白芍高、中、低剂量组,柴胡高、中、低剂量组,空白对照组以及氟西汀组,发现在强迫游泳实验和悬尾实验中各给药组均能明显减少小鼠的不动时间,但柴芍高剂量组对小鼠不动时间的影响更为显著。综上所述,柴胡、白芍配伍使用对比柴胡、白芍单用时抗抑郁效果更明显,且柴胡、白芍配伍使用不仅具有协同作用,还可以减少白芍单煎时有害物质苯甲酸的量、在大鼠的肠道中柴胡皂苷可促进芍药苷的吸收、促进白芍中芍药苷溶出量等积极作用^[11-13]。本研究中的柴胡白芍配伍比例出自明代张介宾《景岳全书》中的柴胡疏肝散,为疏肝解郁的良方,在临床抗抑郁方面,

取得了确切疗效^[13]。

脑内单胺类神经递质 5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)的代谢失常是抑郁症发病机制的经典学说^[14]。目前,国际上抗抑郁的一线药物氟西汀、地西帕就分别是 5-HT 和 NE 的再摄取抑制剂^[15]。柴胡提取液和白芍提取液中发挥主要药理作用的物质分别为柴胡皂苷和芍药苷^[16]。戈宏焱等^[16]用柴芍皂苷对抑郁大鼠进行干预后,发现大鼠脑源性神经营养因子(BDNF)的表达和脑内单胺类神经递质及其代谢产物多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、高香草酸(HVA)的含量在原来下调的基础上均有明显的改善。此外,王静霞等^[17]通过白芍提取液干预抑郁大鼠发现,给药后抑郁大鼠的行为变化显著改善,大鼠脑内 5-羟色胺(5-HT)和去甲肾上腺素(NE)含量增加。

OFT、TST 和 FST 是评价抗抑郁药作用常用的 3 种动物模型^[19,20]。OFT 是一项探究小鼠自发活动和探索运动的经典行为学实验,常用来检测抗抑郁和焦虑药物。其原理是利用啮齿类动物处于抑郁状态时,其活动范围会选择相对安全的旷场箱体四周,避开相对空旷的旷场中央,当啮齿类动物只要进入空旷的中央区域,抑郁样情绪改变的动物,会对向箱体四周活动产生迟疑,进而增加了中央区域停留时间。啮齿类动物被放置在特定的环境中由于无法逃脱,呈现出行为上的绝望,是悬尾和强迫游泳的实验原理。因此该实验选用这 3 种方法评价柴胡白芍提取液的对抑郁样行为的影响,更具有科学性。

本研究通过小鼠行为绝望抑郁模型,发现柴芍中剂量组与氟西汀组可显著增加小鼠在中央区域停留时间,同时柴芍各给药组,因为剂量的差异可以不同程度的影响小鼠强迫游泳和悬尾不动时间,且各组对比空白对照组差异均有统计学意义,这提示柴芍提取液具有较好的抗抑郁效果。柴芍高、中、低剂量组与氟西汀组比较差异无统计学意义,表明利用中药调节抑郁样情绪与西药有着相似的效果,利用柴胡和白芍配伍的中药制剂治疗与抑郁样情绪相关的疾病发展前景相对良好。本研究发现柴芍提取液对小鼠的抑郁样行为具有明显的改善作用,为继续深入研究柴芍提取液的抗抑郁作用提供了有力的支持。也为将柴胡配伍白芍发展成疗效明确,质量可控,作用机制确切的抗抑郁新药奠定了良好的基础。

参考文献

1 胡燕,洪敏. 柴胡类方治疗抑郁症研究[J]. 中国实验方剂学杂

志, 2010, 16(17):247-249

- 2 李葇,高杉,于春泉. 柴胡和白芍配伍抗抑郁作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14):313-316
- 3 陈少丽,陈德兴. 柴胡、白芍药配伍的古今应用[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(3):71-74
- 4 王春艳,张丹参,张万明,等. HPLC/DAD 测定柴胡疏肝散中 4 种活性成分的含量[J]. 中成药, 2010, 32(3):422-425
- 5 王志超,张博,杨小龙,等. 柴胡皂苷防治肝病机制研究进展[J]. 河南科技大学学报:医学版, 2011, 29(4):316-318
- 6 郑世存,李晓宇,欧阳兵,等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(2):100-103
- 7 卜水,林华庆,邓红,等. 正交试验优化“柴胡-白芍”药对提取工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14):20-22
- 8 于春泉,李葇,张敏,等. 柴胡-白芍药对抗抑郁作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23):286-289
- 9 杨洁,瞿融. 柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁症剂量配比与量效学研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 2:64-66
- 10 朱永智,陈鸿英,张桂贤,等. 白芍与柴胡不同比例配伍白芍苷及苯甲酸水煎出量的比较[J]. 天津中医药, 2011, 28(1):78-79
- 11 Chen Y, Wang J, Yuan L, *et al.* Interaction of the main components from the traditional Chinese drug pair Chaihu - Shaoyao based on rat intestinal absorption[J]. *Molecules*, 2011, 16(11):9600-9610
- 12 李春香,丁里玉,丁芳,等. 白芍养血柔肝止痛作用与其配伍及芍药苷含量的相关性研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(1):54-56
- 13 金卫东,邢葆平,王鹤秋,等. 柴胡疏肝散治疗抑郁症对照研究临床疗效的 Meta 分析[J]. 中华中医药学刊, 2009, 7:1397-1399
- 14 李建国,赵博. 中医药对抑郁症单胺类神经递质影响的研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2011, 33(4):129-132
- 15 Shyn SI, Hamilton SP. The genetics of major depression: moving beyond the monoamine hypothesis[J]. *Psychiat Clin North Am*, 2010, 33(1):125-140
- 16 戈宏焱. 柴胡皂苷抗抑郁作用及其机制的研究[D]. 长春:吉林大学, 2010
- 17 王景霞,张建军,李伟,等. 白芍提取物对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及大脑皮质单胺类神经递质的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010, 11:1895-1897
- 18 Yi LT, Xu HL, Feng J, *et al.* Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of nobletin[J]. *Physiol Behav*, 2011, 102(1):1-6
- 19 Idayu NF, Hidayat MT, Moklas MA, *et al.* Antidepressant-like effect of mitragynine isolated from *Mitragyna speciosa* Korth in mice model of depression[J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(5):402-407
- 20 王维刚,刘震泽,吴文婷,等. 小鼠动物实验方法系列专题(七)旷场实验在小鼠行为分析中的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 11:1191-1196

(收稿日期:2018-12-18)

(修回日期:2018-12-24)