

· 药理学 ·

积雪草总苷元对慢性应激抑郁大鼠的影响

曹尉尉¹, 徐江平², 赵娜萍³, 王晶³, 张黎³ (1. 解放军第411医院药械科, 上海 200081; 2. 南方医科大学药学院药理学教研室, 广东广州 510515; 3. 第二军医大学附属长海医院药剂科, 上海 200433)

[摘要] **目的** 观察积雪草总苷元对慢性应激抑郁大鼠行为学及血浆皮质醇(CORT)和促肾上腺皮质激素(ACTH)的影响。**方法** 采用长期慢性不可预知应激刺激制备慢性应激抑郁模型, 通过旷场试验, 测定大鼠的行为, 以液体消耗实验中糖水消耗量、糖水偏爱百分比作为快感缺乏的客观指标。放射免疫分析方法测定血浆 CORT、ACTH 浓度。**结果** 慢性应激抑郁大鼠敞箱实验中的水平运动、垂直运动得分显著减少, 中央格停留时间显著延长, 糖水偏爱度明显下降, 且其血浆 CORT 和 ACTH 含量增加。积雪草总苷元显著改善慢性应激抑郁大鼠模型的行为学和神经内分泌变化, 垂直运动得分增加, 血浆 CORT、ACTH 含量降低。**结论** 积雪草总苷元具有抗抑郁活性, 与改善下丘脑-垂体-肾上腺轴功能相关。

[关键词] 积雪草总苷元; 抑郁; 皮质醇; 促肾上腺皮质激素

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)02-0121-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.02.012

Effects of total aglycone of *centella asiatica* on depressed rats by chronic unpredicted mild stress

CAO Wei-wei¹, XU Jiang-ping², ZHAO Na-ping³, WANG Jing³, ZHANG Li³ (1. Department of Pharmacy, No. 411th Hospital of PLA, Shanghai 200081, China; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Department of Pharmacy, Changhai Hospital affiliated to Second military medical university, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate effects of total aglycone of *centella asiatica* on depressed rats and study plasma levels of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisol (CORT). **Methods** The chronic mild stress depressed rats were produced by long-term unpredicted mild stress. The behavior of rats was detected by open field test. Objective index of anhedonia were sucrose water consumption and preference percentage of sucrose water in liquid consumption test. The levels of plasma ACTH and CORT were measured by radioimmunoassay. **Results** The depressed rats experienced less squares crossed, rears in the open-field test. Sucrose consumption in the sucrose preference test decreased significantly. The concentration of plasma ACTH and CORT significantly increased in stress-model rats compared to the control rats. The behavioral disorders and the levels of plasma ACTH and CORT of rats were improved by total aglycone of *centella asiatica* significantly. **Conclusion** Total aglycone of *centella asiatica* had anti-depressant effects, and which mechanism might be related to the improvement of hypothalamus-pituitary gland-adrenal glands axis function.

[Key words] total aglycone of *centella asiatica*; depression; corticosteroid; adrenocorticotropin

随着人们生活节奏的加快、工作压力的增大, 抑郁症的发病率逐年增加, 大大地降低了人们的生活质量, 严重影响正常工作和学习。抑郁症已成为现代社会的常见病、多发病。积雪草为《中国药典》收录的常用中药, 为伞形科积雪草属植物积雪草(*Centella asiatica* L. Urban.) 的干燥全草, 始载于《神农本草经》, 主要分布于南方地区, 具有清热利湿、解毒

消肿的功效^[1], 临床上多用于治疗跌打损伤、皮肤病等^[2]。近年来研究结果显示, 积雪草能拮抗利舍平诱导的眼睑下垂, 减少小鼠强迫游泳不动时间, 体外实验可降低单胺氧化酶 A 的活性, 调节脑内氨基酸的含量, 具有抗抑郁作用^[3-6]。本文研究了积雪草总苷元对慢性应激抑郁大鼠行为学及血浆 CORT 和 ACTH 的影响, 为探讨其抗抑郁作用机制提供药理学依据。

1 材料

积雪草总苷元(纯度 95%, 广西昌洲天然产物开发有限公司, 批号 20090315), 皮质醇放射免疫分析药盒(批号 20100403)、促肾上腺皮质激素放射免

[基金项目] 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金(ejd09031, ejd09038)。

[作者简介] 曹尉尉(1959-), 女, 硕士, 主任药师。Tel: (021)65407620, E-mail: sophia0904@126.com。

[通讯作者] 张黎。Tel: (021)81873750, E-mail: lizhang@smmu.edu.cn。

疫分析药盒(批号 20100609)由北京北方生物技术研究所提供;敞箱自制,敞箱装置由不透明木材制造,底面为 75 cm × 75 cm 的正方形且被等分为 25 个等边方格,周围为高 40 cm 的木墙,装置由黑色漆料涂满;SN-682 型放射免疫计数器,上海核福光电公司生产。

2 方法

2.1 动物及分组 成年 Sprague-Dawley 雄性大鼠 40 只(清洁级),180 ~ 200 g,由南方医科大学实验动物中心提供,合格证号:20060051。严格控制条件下饲养:自由饮食、光/暗周期为 12 h/12 h(光照时间 6:00 ~ 18:00),背景噪音(40 ± 10)db,温度(20 ± 3)℃。实验前用旷场分析实验对每只大鼠进行行为学评分,敞箱实验水平运动和垂直运动总得分 < 30 分或 > 120 分的动物予以剔除。根据敞箱实验和液体消耗实验的结果,选择各项行为学指标得分相近的大鼠 40 只,适应环境饲养 3 d 后,随机分为 5 组:空白对照组;慢性应激抑郁模型对照组(简称模型组);西酞普兰组,ESC(4 mg/kg);积雪草总苷元低剂量组(TACA, 50 mg/kg);积雪草总苷元高剂量组(TACA, 100 mg/kg);各组动物数均为 8 只。

2.2 方法 慢性应激抑郁模型的制备参照文献的方法并加以改进^[5],动物模型为慢性轻度不可预见性的应激模型(chronic unpredicted mild stress, CUMS)加孤养模型。模型组、ESC 各组大鼠均单居饲养。造模方法要点如下:将禁水(24 h)、夹尾(1 min)、45℃环境(5 min)、4℃冰水游泳(5 min)、昼夜颠倒(24 h)、禁食(24 h)、电击足底(电压 50 mv,每隔 50 s 刺激 1 次,每次持续 10 s,30 次)、居住环境改变(潮湿垫料、鼠笼倾斜)、昼夜颠倒(24 h)等刺激随机安排到 18 d 内,每日给予 1 种刺激,使大鼠不能预料刺激的发生,以避免发生适应性。从造模第一天起每天 8:00 予给药组及模型组大鼠灌胃,连续 21 d。空白对照组正常饮水饮食喂养,模型组给予等量生理盐水。

2.3 观察内容 造模结束后对其进行敞箱实验,测定大鼠的行为。采用液体消耗实验中糖水消耗量、糖水偏爱百分比作为快感缺乏的客观指标。

2.3.1 旷场分析试验 8:00 ~ 10:00 之间在安静的房间内进行此试验观察。将大鼠放入敞箱中心方格内,观察大鼠在 5 min 内中央格停留时间、穿越格数(四爪均进入的方格才记数,为水平运动得分)、后肢直立次数(两前爪腾空或攀附墙壁,为垂直运动得分),并观察记录清洁运动记数。彻底清洁敞箱后再进行下一次观察。

2.3.2 液体消耗试验 试验前在安静的房间内,训练动物适应含糖饮水,每笼同时放置 2 个水瓶,第一个 24 h,两瓶均为 1% 蔗糖水,随后的 24 h,1 个瓶装 1% 蔗糖水,1 个瓶装纯水。24 h 的禁食禁水后,进行动物的基础/纯水消耗试验,给予每只大鼠事先定量好的两瓶水:一瓶 1% 蔗糖水,一瓶纯水,60 min 后,两瓶取水定量。计算动物的总液体消耗糖水消耗、纯水消耗、糖水偏爱(糖水偏爱 = 糖水消耗/液体消耗 × 100%)。

2.4 血浆皮质醇(CORT)、促肾上腺皮质激素(ACTH)浓度测定 各组大鼠在第 22 天上午 8:00 ~ 10:00 断头取血 5 ml,其中 2 ml 加入到含 10% EDTA 二钠 30 μl 和抑肽酶 20 μl 的试管,混匀,4℃,3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆放置 -20℃冰箱保存,待测 ACTH;另 2 ml,4℃,3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆放置 -20℃冰箱保存,待测 CORT。

2.5 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析,组间差异采用方差分析,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准。

3 结果

3.1 应激及给药前后敞箱试验、液体消耗试验结果 模型组动物在造模前其水平运动得分、垂直运动得分、中央格停留时间和糖水偏爱度和空白对照组及 ESC 各组测量值相近,组间比较经统计学检验差异无显著性($P > 0.05$)。经过 21 d 慢性轻度不可预见性应激后,模型组大鼠的水平运动得分、垂直运动得分、糖水偏爱各指标测值明显减少,与空白对照组相比较,差异性有显著性($P < 0.01$),而模型组大鼠的中央格停留时间增加,与空白对照组比较,差异有显著性($P < 0.05$),模型组大鼠的清洁动作次数与其它组相比,有减少的趋势。经过 21 d 治疗后,ESC 组值与模型组比较,其水平运动得分和糖水偏爱度均有明显提高,中央格停留时间减少,差异有显著性($P < 0.05$),TACA 低剂量组与模型组相比,其垂直运动得分有上升趋势,而 TACA 高剂量组与模型组相比,垂直运动得分明显升高,差异有显著性($P < 0.05$)。液体消耗试验结果显示,TACA 低、高剂量组与模型组相比较,应激后大鼠糖水偏爱百分比显著升高,有显著性差异($P < 0.05$)。见表 1 和表 2。

3.2 应激及给药后各组大鼠血浆 CORT 和 ACTH 含量的变化 如表 3 示:模型组血浆 CORT、ACTH 含量明显高于空白对照组($P < 0.01$)。TACA 各组血浆 CORT、ACTH 含量下降,与模型组相比差异有显著性($P < 0.05$)。

表1 各组应激前、后旷场试验的结果比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	水平运动得分 (min)		垂直运动得分 (min)		中央格停留时间 (s)	
		应激前	应激后	应激前	应激后	应激前	应激后
空白对照组		87.20 ± 10.72	83.30 ± 19.77	17.25 ± 3.88	15.63 ± 6.21	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组		80.25 ± 8.55	6.00 ± 4.38 ²⁾	19.63 ± 3.92	2.13 ± 1.96 ²⁾	1.63 ± 0.74	19.25 ± 40.90 ¹⁾
ESC组	2	79.25 ± 7.50	68.67 ± 25.46 ²⁾	19.75 ± 4.90	10.89 ± 5.62 ³⁾	1.80 ± 1.48	3.38 ± 2.00 ³⁾
TACA 低剂量组	50	82.80 ± 15.42	74.88 ± 17.47 ⁴⁾	21.38 ± 3.54	7.88 ± 3.83	1.00 ± 0.00	1.88 ± 1.73 ³⁾
TACA 高剂量组	100	82.00 ± 13.16	62.00 ± 13.08 ⁴⁾	21.38 ± 5.24	14.14 ± 11.82 ⁴⁾	1.50 ± 0.54	1.43 ± 0.54 ³⁾

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与空白对照组相比; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.05$, 与模型组相比

表2 大鼠清洁动作次数和液体消耗实验结果对比 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	清洁动作 (次)		糖水消耗偏爱 (%)	
		应激前	应激后	应激前	应激后
空白对照组		2.38 ± 1.30	2.00 ± 1.07	69.38 ± 18.75	85.56 ± 13.22
模型组		2.75 ± 1.49	1.25 ± 0.89	74.75 ± 7.25	48.25 ± 13.79 ¹⁾
ESC组	2	4.50 ± 2.62	2.89 ± 1.36	68.00 ± 4.66	89.50 ± 12.49 ²⁾
TACA 低剂量组	50	2.63 ± 1.06	3.25 ± 3.92	68.75 ± 12.77	83.00 ± 12.68 ²⁾
TACA 高剂量组	100	1.88 ± 0.99	1.902 ± 0.72	79.88 ± 27.89	77.78 ± 13.28 ²⁾

¹⁾ $P < 0.01$, 与空白对照组相比; ²⁾ $P < 0.05$, 与模型组相比

表3 各组血浆皮质醇 (CORT)、促肾上腺皮质激素 (ACTH) 浓度变化 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	CORT (ng/ml)	ACTH (pg/ml)
空白对照组	—	0.41 ± 0.21	34.55 ± 4.60
模型组	—	5.85 ± 2.52 ²⁾	53.07 ± 5.73 ²⁾
TACA 低剂量组	50	3.60 ± 2.39 ^{2),4)}	48.39 ± 4.86 ¹⁾
TACA 高剂量组	100	1.77 ± 1.72 ⁴⁾	31.35 ± 22.92 ⁴⁾
Esc组	2	0.68 ± 0.47 ⁴⁾	36.59 ± 17.11 ³⁾

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与空白对照组相比; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, 与模型组相比

4 讨论

抑郁症是一种常见的精神疾病,以情感持续性低落为基本特征,常伴有思维迟钝和行为迟滞以及各种躯体化症状,在我国的发病率为 1.3% ~ 19.1%,并呈逐年上升的趋势^[7]。但抑郁症的发病机制复杂,目前还未完全阐明。

笔者曾报道了^[8]积雪草总三萜酸的主要成分积雪草酸 (asiatic acid, AA)、羟基积雪草酸 (madecassic acid, MA) 的具有抗抑郁活性,初步机制研究发现^[9]积雪草总苷元 (包括积雪草酸和羟基积雪草酸) 抗抑郁作用与抑制单胺氧化酶作用、增加 5-羟色胺作用有关。本研究通过制备大鼠慢性应激抑郁模型,进行旷场试验和液体消耗实验考察积雪草总苷元对慢性应激抑郁大鼠行为学影响。实验结果显示,各组动物在造模前其水平运动得分、垂直运动得分、中央格停留时间和糖水偏爱度等测量值相近,组间比较经统计学检验差异无显著性 ($P > 0.05$)。经过 21 d 慢性轻度不可预见性应激后,ESC 组值与模型组比较,其水平运动得分、中央格停留时间和糖水偏爱度均有明显提高,差异有显著性 ($P < 0.01$),

TACA 低剂量组与模型组相比,其垂直运动得分有上升趋势,而 TACA 高剂量组与模型组相比,垂直运动得分明显升高,差异有显著性 ($P < 0.05$)。液体消耗试验结果显示,TACA 低、高剂量组与模型组相比较,应激后大鼠糖水偏爱百分比显著升高,有显著性差异 ($P < 0.05$)。实验结果表明,积雪草总苷元能显著改善慢性应激抑郁行为。

研究表明,一些精神疾病如抑郁症、焦虑症、老年痴呆与糖皮质激素的过度分泌也都有着一定的因果联系。应激刺激是抑郁症的发病因素之一,会导致下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴功能亢进,糖皮质激素分泌增加。皮质醇是啮齿类动物主要的糖皮质激素,其水平能反映抑郁症的严重程度^[10]。本实验结果显示,长期未预知的刺激作为一种应激源引起模型大鼠血清皮酮水平显著升高,内分泌激素分泌失调,下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴功能亢进,与报道应激刺激使大鼠血清皮质酮的水平升高一致。本实验中模型组血浆 CORT、ACTH 含量明显高于空白对照组 ($P < 0.01$)。TACA 低、高剂量组血浆 CORT、ACTH 含量下降,与模型组相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。说明积雪草总苷元可以显著抑制慢性应激抑郁大鼠的抑郁程度。

研究结果表明积雪草总苷元有效抑制抑郁症模型升高的血浆皮质醇、促肾上腺皮质激素,可能与改善下丘脑-垂体-肾上腺轴功能进而发挥抗抑郁作用相关。

【参考文献】

[1] 齐红梅,王冬梅. 积雪草化学成分及药理研究进展[J]. 中国药业, 2010,19(16):89.

- [2] Gohil KJ, Patel JA, Gajjar AK, *et al.* Pharmacological review on *Centella asiatica*: a potential herbal cure-all [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2010, 72(5):546.
- [3] 谷莉, 姜子洋, 柴逸峰. 积雪草及中药配方颗粒的研究进展 [J]. *药学实践杂志*, 2003, 21(6):331.
- [4] 张中启, 袁莉, 罗质璞. 积雪草提取物抑制小鼠体外单胺氧化酶 A 的活性 [J]. *军事医学院院刊*, 2000, 24(2):158.
- [5] 陈瑶, 韩婷, 秦路平, 等. 积雪草总甙对实际性抑郁症小鼠脑内氨基酸含量的影响 [J]. *中药材*, 2003, 26(12):870.
- [6] 周婕, 张冬齐, 孙莉莎, 等. 草酸——西酞普兰对慢性应激抑郁大鼠行为学及血浆 CORT 和 ACTH 的影响 [J]. *中国新药杂志*, 2006, 15(14):1160.
- [7] 陈利平, 李外, 林明雄, 等. 舒郁散对慢性应激性抑郁大鼠行为的影响 [J]. *中国药物应用与监测*, 2007, 4(6):19.
- [8] 曹尉尉, 陆波. 积雪草总三萜酸及其主要成分的抗抑郁活性研究 [J]. *药学实践杂志*, 2008, 26(3):185.
- [9] 曹尉尉, 李晏, 伊佳. 积雪草总苷元抗抑郁作用机制的初步研究 [J]. *解放军药学报*, 2009, 25(1):40.
- [10] Wijeweera P, Arason JT, Koszycki D, *et al.* Evaluation of anxiolytic properties of Gotukola-(*Centella asiatica*) extracts and asiaticoside in rat behavioral models [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13(9-10):668.

[收稿日期]2011-02-14

[修回日期]2011-10-08

(上接第91页)

- [3] Maria K, Mateyak, Kinzy TG. eEF1A: Thinking outside the ribosome [J]. *J Biol Chem*, 2010, 5(4):432.
- [4] Ejiri Shin ichiro. Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein r1-associated nuclear localization [J]. *Biotechnol Biochem*, 2002, 66(1):1.
- [5] Khalyfa A, Bourbeau D, Chen E, *et al.* Characterization of Elongation Factor-1A (eEF1A-1) and eEF1A-2/S1 Protein Expression in Normal and wasted Mice [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(25):22915.
- [6] Newbery HJ, Loh DH, Donoghue JE, *et al.* Translation elongation factor eEF1A2 is essential for post-weaning survival in mice [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(39):28951.
- [7] Pan J, Ruest LB, Xu SY, *et al.* Immuno-characterization of the switch of peptide elongation factors eEF1A-1/EF-1a and eEF1A-2/S1 in the central nervous system during mouse development [J]. *Dev Brain Res*, 2004, 149:1.
- [8] Andersen GR, Nissen P, Nyborg J. Elongation factors in protein biosynthesis [J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(8):434.
- [9] Villa E, Sengupta J, Trabuco LG, *et al.* Ribosome-induced changes in elongation factor Tu conformation control GTP hydrolysis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106(4):1063.
- [10] Ruest LB, Marcotte R, Wang E. Peptide elongation factor eEF1A-2/S1 expression in cultured differentiated myotubes and its protective effect against caspase3-mediated apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(7):5418.
- [11] Borradaile NM, Buhman KK, Listenberger LL, *et al.* A critical role for eukaryotic elongation factor 1A1 in lipotoxic cell death [J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17:770.
- [12] Talapatral S, Wagner J, Thompson CB. Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis [J]. *Cell Death and Differ*, 2002, 9:856.
- [13] Li HT, Su YP, Cheng TM, *et al.* The interaction between interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats-1 and eukaryotic elongation factor-1A [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 337:101.
- [14] Mansilla F, Hansen LL, Jakobsena H, *et al.* Deconstructing PTI-1: PTI-1 is a truncated, but not mutated form of translation elongation factor 1A1, eEF1A1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1727(2):116.
- [15] Zhang JP, Guo HT, Mi ZY, *et al.* EF1A1-actin interactions alter mRNA stability to determine differential osteopontin expression in HepG2 and Hep3B cells [J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315:304.
- [16] Anand N, Urthy S, Mann G, *et al.* Protein elongation factor eEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer [J]. *Nat Genet*, 2002, 31:301.
- [17] Tomlinson VA, ewbery HJ, ray NR, *et al.* Translation elongation factor eEF1A2 is a potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours [J]. *BMC cancer*, 2005, 5:113.
- [18] Morikawa E, Moskowitz M, Huang Z, *et al.* L-Arginine infusion promotes nitric oxide dependent vasodilation, increases regional blood flow and reduces infarct volume in the rat [J]. *Stroke*, 1994, 25(2):429.
- [19] Yan GJ, You B, Chen SP, *et al.* Tumor necrosis factor- α downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1A1 [J]. *Circ Res*, 2008, 103(12):591.
- [20] Picchi A, Gao X, Belmadani S. Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome [J]. *Circ Res*, 2006, 99:69.
- [21] Agnoletti L, Curello S, Bachetti T, *et al.* Serum from patients with severe heart failure downregulates eNOS and is proapoptotic: role of tumor necrosis factor- α [J]. *Circulation*, 1999, 100:1983.
- [22] Gross SR, Kinzy TG. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of actin cytoskeleton and cell morphology [J]. *Nat Struct Mol Boil*, 2005, 12:772.
- [23] Leclercq TM, Moretti PAB, Vadas MA, *et al.* Eukaryotic elongation factor 1A interacts with sphingosine kinase and directly enhances its catalytic activity [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283:9606.
- [24] Gillardon F. Interaction of elongation factor 1-a with leucine-rich repeat kinase 2 impairs kinase activity and microtubule bundling in vitro [J]. *Neuroscience*, 2009, 163:533.
- [25] Yuka Hotokezaka, Udo Tobben, Hitoshi Hotokezaka, *et al.* Interaction of the Eukaryotic Elongation Factor 1A with Newly Synthesized Polypeptides [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(21):18545.
- [26] Shamovsky Iiya, Ivannikov Maxim, Kandel ES, *et al.* RNA-mediated response to heart shock in mammalian cells [J]. *Nature*, 2006, 440(23):556.

[收稿日期]2011-07-14

[修回日期]2011-12-05