

本文引用:王海兰,周湘乐,谭婷,肖碧跃.百合地黄汤对抑郁症大鼠血清 IL-10 和海马 DA 的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(11):1326-1330.

## 百合地黄汤对抑郁症大鼠血清 IL-10 和海马 DA 的影响

王海兰,周湘乐,谭婷,肖碧跃\*  
(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

**〔摘要〕**目的 探讨百合地黄汤对慢性应激性抑郁模型大鼠血清抗炎因子白介素-10(interleukin-10,IL-10)和海马神经递质多巴胺(dopamine,DA)表达水平的影响,为其治疗抑郁症提供依据。**方法** 将 50 只雌性成年 SD 大鼠随机分为空白对照组,模型组,百合地黄汤低、高剂量组,氟西汀组等 5 组,每组 10 只,采用慢性应激刺激和独立隔离喂养相结合的方法建立抑郁大鼠模型,模型组与空白对照组正常饲养,其余组在造模的基础上给予相应干预。造模 28 d 以旷场实验、强迫游泳实验进行行为学检测,ELISA 法检测各组大鼠血清抗炎因子 IL-10 的水平,免疫组化法检测大鼠海马神经递质 DA 的表达。**结果** 与空白对照组对比,模型组旷场实验总分降低,强迫游泳不动时间延长,血清抗炎因子 IL-10 和海马神经递质 DA 含量明显下降( $P<0.01$ );与模型组对比,百合地黄汤低剂量组、高剂量组旷场实验总分升高,强迫游泳不动时间缩短,血清抗炎因子 IL-10 和海马神经递质 DA 含量显著增加( $P<0.01$ )。**结论** 百合地黄汤抗抑郁模型大鼠的抑郁状态,可能与其能够有效干预血清中抗炎因子 IL-10 和海马神经递质 DA 有关。

**〔关键词〕** 百合地黄汤;白介素-10;多巴胺;抑郁症

**〔中图分类号〕**R285.5;R749.2 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.11.024

### Effect of Baihe Dihuang Decoction on Serum Anti-inflammatory Factor Interleukin-10 and Hippocampal Neurotransmitter Dopamine in Rats with Depression

WANG Hailan, ZHOU Xiangle, TAN Ting, XIAO Biyue\*  
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**〔Abstract〕 Objective** To investigate the effect of Baihe Dihuang Decoction on serum anti-inflammatory factor interleukin-10 (IL-10) and hippocampal neurotransmitter dopamine (DA) in rats with depression induced by chronic stress, and to provide a basis for the role of Baihe Dihuang Decoction in the treatment of depression. **Methods** A total of 50 adult female Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank control group, model group, low- and high-dose Baihe Dihuang Decoction groups, and fluoxetine group, with 10 rats in each group. A rat model of depression was established by chronic stress stimulation and isolated feeding. After the model was established, the rats in the model group and the blank control group were given normal feeding, and those in the other groups were given corresponding intervention. On day 28 after modeling, the open field test and forced swimming test were used for behavioral assessment, ELISA was used to measure the serum level of IL-10, and immunohistochemistry was used to measure the expression of DA in the hippocampus. **Results** Compared with the blank control group, the model group had a significant reduction in the total score of open field test, a significant increase in immobility time in forced swimming test, and

**〔收稿日期〕**2018-01-03

**〔基金项目〕**湖南省科技厅项目(2015JC3077)。

**〔作者简介〕**王海兰,女,在读硕士研究生,研究方向:《金匱要略》治则治法理论与经方研究。

**〔通讯作者〕**\*肖碧跃,女,医学博士,教授,硕士研究生导师,E-mail:704194134@qq.com。

significant reductions in serum IL-10 and hippocampal DA ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the low- and high-dose Baihe Dihuang Decoction groups had a significant increase in the total score of open field test, a significant reduction in immobility time in forced swimming test, and significant increases in serum IL-10 and hippocampal DA ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Baihe Dihuang Decoction exerts a therapeutic effect on depressive state in rats with depression, possibly by effectively regulating serum IL-10 and hippocampal DA.

[**Keywords**] Baihe Dihuang Decoction; interleukin-10; dopamine; depression

百合地黄汤首现于《金匱要略》,由百合、生地黄组成,主治百合病。百合病症状与抑郁症类似,以精神恍惚、神志不定为主要症状。临床上运用百合地黄汤治疗抑郁症取得了显著疗效。大量的研究证明,抑郁症的发生与体内抗炎因子和神经递质多巴胺(dopamine,DA)的减少关系密切。赵敏<sup>[1]</sup>在研究中发现,抑郁症的发生和进展可能与血清中细胞抗炎因子白介素-10(Interleukin 10,IL-10)的降低相关。郑蕾等<sup>[2]</sup>发现抑郁症患者血清 IL-10 在免疫应答中发挥负反馈调节作用,可抑制炎性细胞激活、迁移,抑制 IFN- $\gamma$ 、IL-6 等因子的合成与释放,维持机体免疫平衡。李艺等<sup>[3]</sup>在研究单胺递质对抑郁症的影响机制中提出单胺递质和抗炎因子水平的下降与抑郁症的发生密切相关。因此,抑郁症与抗炎细胞因子 IL-10 和神经递质 DA 之间关系的研究已成为近年来基础和临床研究的重点<sup>[4]</sup>。百合地黄汤治疗抑郁症有显著疗效。本文采用 ELISA、免疫组化等方法研究百合地黄汤对抑郁模型大鼠血清 IL-10 和海马 DA 含量的影响,进一步探讨百合地黄汤抗抑郁症的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

选择动物生产许可证编号为[SCXK(湘)2016-0002]的健康雌性 SPF SD 大鼠 50 只,体质量约 180~220 g。饲养地点:湖南中医药大学实验动物中心。实验设计和实施得到湖南中医药大学动物中心动物伦理委员会的批准,符合动物福利和伦理的要求。室温 20~25  $^{\circ}\text{C}$ ,光照节律 8:00-18:00,实验条件下自然饮食,适应环境 7 d 后进行实验。

### 1.2 药品

根据《金匱要略》的记载,百合的剂量只有百合七枚,未具体说明日服量,参考文献[5]中 70 kg 成人

临床百合剂量约 40 g,生地黄约 35 g。百合、生地黄统一由湖南中医药大学中医附一门诊部提供。由湖南中医药大学附一医院制剂室加工配制,水煮浓缩为按生药量计 2 g/mL。消毒后封瓶,放入冰箱备用。盐酸氟西汀(常州四药制药有限公司,批号:201608172)。

### 1.3 试剂

大鼠白细胞介素-10 试剂盒(武汉基因美科技有限公司,批号:201706);一抗兔抗鼠 DA 抗体(北京中杉金桥,批号:BS-1126R);DAB 显色剂(北京中杉金桥,批号:K166622C);二抗生物素化山羊抗大鼠 IgG,PV9000 型(北京中杉金桥,批号:K165214A)等。

### 1.4 仪器

2235 型轮转石蜡切片机(美国徕卡 RM 公司);6.0 数码医学图像分析系统(中国 Motic 公司);58108 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);AL204 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);自制大鼠夹尾盒;HY-5 型振荡器(中国常州智博瑞仪器厂);自制黑白颠倒箱;自制束缚绳多条;直径 20 cm,深 70 cm 的透明水缸 1 个。

## 2 方法

### 2.1 大鼠分组和抑郁模型的建立

经过 1 周适应性喂养,行为学评分后将大鼠分为空白对照组、模型组、百合地黄汤低剂量组及高剂量组、氟西汀组,每组 10 只。空白对照组在正常环境中饲养,不给予任何刺激。其他组采用慢性应激刺激和独立隔离喂养相结合方法造模<sup>[6]</sup>。在造模过程中,每天选择 1 种随机应激刺激。每种刺激平均出现次数不超过 3 次,不连续出现。具体方法包括:束缚 3 h,夹尾 2 min,禁食 24 h,禁水 24 h,振荡 30 min,冷水游泳 5 min(6  $^{\circ}\text{C}$ ),黑白颠倒。造模 28 d 进行旷场和强迫游泳等行为学实验。实验结束

时,采集麻醉后大鼠血样和脑组织备用。

## 2.2 干预

给药量按照《中药药理实验方法学》<sup>[7]</sup>中人体和动物体表面积用药剂量换算法,大鼠需百合地黄汤低 3.2 g/(kg·d)、高 12.8 g/(kg·d);氟西汀组大鼠给药约为 1.8 mg/(kg·d),用生理盐水溶解配成溶液。模型组与空白对照组:蒸馏水灌胃 2 g/(kg·d)。造模灌胃同时进行,连续干预 28 d。

## 2.3 行为学测试<sup>[6]</sup>

**2.3.1 旷场试验** 将大鼠放入敞箱中间,记录 3 min 内大鼠穿过方格的数量,三足以上穿过一格为 1 分,水平穿过的格子总数为水平运动分数;同时统计其双足垂直离地的次数,垂直离地一次为 1 分,垂直离地的次数为大鼠垂直运动的得分。水平运动和垂直运动总和为旷场运动得分。本试验可检测大鼠自主活动能力和对外界的好奇程度,慢性应激处理后的大鼠旷场试验得分会明显降低。

**2.3.2 强迫游泳试验** 将大鼠放入直径 20 cm,深 70 cm 的透明水缸内,保持水温 25 ℃,放入大鼠适应性游泳 1 min,然后记录大鼠 4 min 内游泳不动的时间,本试验可反映大鼠在紧急情况下本能的求生欲望,慢性应激处理后大鼠的游泳不动时间会延长。

## 2.4 IL-10 检测

3%戊巴比妥钠 0.3~0.4 mL 注入腹腔内麻醉大鼠,腹主动脉取 5 mL 血液,保留标本。常温静置 1 h 后放入离心机进行离心。4 ℃,1 500 r/min,离心 15 min,取上部血清,-80 ℃冰箱保存。根据试剂盒说明书用 ELISA 法检验血清中抗炎因子 IL-10。

## 2.5 DA 检测

麻醉大鼠后,取出海马组织并于 4 ℃下 4%多聚甲醛中固定 4 h。将海马组织用 3 种梯度乙醇(分别为 75%,95%和 100%)脱水,浸蜡,包埋,切片,留待备用。免疫组织化法<sup>[8]</sup>检测大鼠海马 DA 含量。用常规法为海马切片,脱蜡至水,用 3% $H_2O_2$  对内源酶进行灭活;PBS 洗涤 3 次/2 min;滴兔抗鼠 DA 抗体(1:100 比例稀释);4 ℃孵育过夜,PBS 洗涤 3 次/2 min。20~37 ℃条件下滴加生物素化山羊抗大鼠 IgG,20 min 后再次 PBS 洗涤 3 次/2 min。20~37 ℃条件下滴 SABC,20 min,PBS 洗涤 5 min×4 次,

DAB 染色,蒸馏水洗涤,苏木素染色,脱水,透明,密封,400 倍光镜下观测,大鼠海马区棕黄色染色颗粒为神经递质 DA 的阳性表达。

## 2.6 统计方法

数据处理选择 SPSS 20.0 软件,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。组间差异比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐时采用 LSD 检验法,不齐时采用 Dunnett's T3, $P < 0.05$  时差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠行为学比较

**3.1.1 旷场测试结果** 与空白对照组对比,模型组大鼠旷场总分下降( $P < 0.01$ );与模型组对比,百合地黄汤低剂量组、高剂量组,氟西汀组旷场总分显著上升( $P < 0.01$ );与百合地黄汤低剂量组对比,百合地黄汤高剂量组、氟西汀组大鼠旷场总分显著上升( $P < 0.01$ )。百合地黄汤高剂量组和氟西汀组旷场总分差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见表 1。

**3.1.2 强迫游泳测试结果** 与空白对照组对比,模型组大鼠强迫游泳不动时间延长( $P < 0.01$ );与模型组对比,百合地黄汤低剂量组、百合地黄汤高剂量组、氟西汀组强迫游泳不动时间缩短( $P < 0.01$ );与百合地黄汤低剂量组对比,百合地黄汤高剂量组、氟西汀组强迫游泳不动时间明显缩短( $P < 0.01$ );百合地黄汤高剂量组和氟西汀组强迫游泳不动时间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见表 1。

表 1 各组大鼠行为学比较 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	旷场总分/(分·3 min <sup>-1</sup> )	强迫游泳/(s·4 min <sup>-1</sup> )
空白对照组	79.12±17.14	2.09±0.51
模型组	29.13±8.94 <sup>▲▲</sup>	8.67±1.50 <sup>▲▲</sup>
百合地黄汤低剂量组	49.31±8.39 <sup>△△</sup>	6.98±1.90 <sup>△△</sup>
百合地黄汤高剂量组	75.72±8.01 <sup>△△**</sup>	2.07±0.44 <sup>△△**</sup>
氟西汀组	70.90±3.84 <sup>△△**</sup>	3.29±0.92 <sup>△△**</sup>
<i>F</i>	42.45	61.03
<i>P</i>	0.00	0.00

注:与空白对照组比较,▲▲ $P < 0.01$ ;与模型组比较,△△ $P < 0.01$ ;与低剂量组比较,\*\* $P < 0.01$ 。

### 3.2 各组大鼠血清抗炎因子 IL-10 含量比较

与空白对照组对比,模型组含量明显降低( $P < 0.01$ );与模型组对比,百合地黄汤低剂量组、高剂量

组,氟西汀组含量增高( $P<0.01$ );与百合地黄汤低剂量组对比,百合地黄汤高剂量组和氟西汀组含量增高( $P<0.01$ );百合地黄汤高剂量组和氟西汀组对比,其含量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结果见表 2。

### 3.3 各组大鼠海马神经递质 DA 的表达比较

与空白对照组对比,模型组 DA 的表达明显降低( $P<0.01$ );与模型组对比,百合地黄汤低剂量组、高剂量组与氟西汀组差异显著( $P<0.01$ );与百合地黄汤低剂量组对比,百合地黄汤高剂量组与氟西汀组差异显著( $P<0.01$ )。百合地黄汤高剂量组和氟西汀组对比,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与空白对照组比较,模型组及百合地黄汤低剂量组大鼠海马结构紊乱,棕黄色染色颗粒较少且染色浅,表示 DA 阳性表达较少;与模型组比较,百合地黄汤高剂量组、氟西汀组海马区棕黄色染色颗粒增多且染色深,与空白对照组接近,提示治疗后 DA 阳性表达增多;与百合地黄汤低剂量组比较,百合地黄汤高剂量组海马区棕黄色染色颗粒更多,染色更深,提示百合地黄汤溶剂剂量高,则 DA 阳性表达更高,百合地黄高剂量组与氟西汀组差异无统计学意义。结果见表 2、图 1。

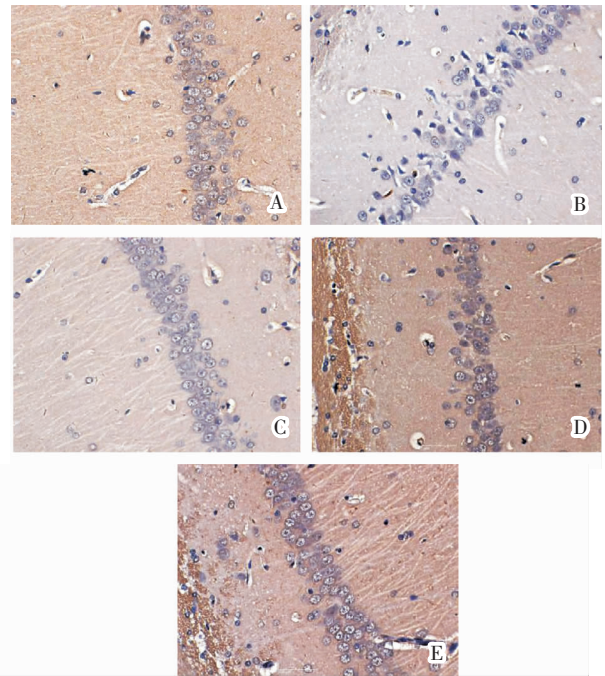
表 2 各组大鼠血清 IL-10 和海马 DA 的表达比较 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	IL-10 浓度/(pg·mL <sup>-1</sup> )	DA 的表达光密度
空白对照组	85.38±18.54	0.29±0.027
抑郁模型组	64.24±4.94 <sup>▲▲</sup>	0.15±0.033 <sup>▲▲</sup>
百合地黄汤低剂量组	82.33±12.5 <sup>△△</sup>	0.16±0.040 <sup>△△</sup>
百合地黄汤高剂量组	96.16±9.08 <sup>△△**</sup>	0.27±0.024 <sup>△△**</sup>
氟西汀组	88.75±18.77 <sup>△△**</sup>	0.26±0.015 <sup>△△**</sup>
<i>F</i>	6.60	22.07
<i>P</i>	0.00	0.00

注:与空白对照组比较,▲▲ $P<0.01$ ;与模型组比较,△△ $P<0.01$ ;与低剂量组比较,\*\* $P<0.01$ 。

## 4 讨论

血清白细胞 IL-10 属于抗炎因子,小鼠 Th2 细胞家族被抗原或有丝分裂原刺激后可分泌 IL-10,不但可抑制小鼠 TH1 细胞的增生和炎性细胞因子合成<sup>[9]</sup>还可刺激 B 细胞分化增殖,促进抗体的形成。Firus 等<sup>[10]</sup>发现 IL-10 通常会抑制促炎性细胞因子的作用和炎症反应的发生,IL-10 的降低会推动抑郁炎症性疾病慢性发展,促进促炎性细胞因子水平升高,导致严重抑郁症的发生。在 DNA 和氨基酸水平



注:A.空白对照组;B.模型组;C.百合地黄汤低剂量组;D.百合地黄汤高剂量组;E.氟西汀组。

图 1 各组大鼠海马神经递质 DA 光镜图(免疫组化,×400)

上人和大鼠 IL-10 拥有 81%和 73%的相似性<sup>[11]</sup>。所以,本实验构建大鼠抑郁模型选用慢性轻度不可预知的应激形式。

现代对抑郁症病因的研究有多种假说,单胺神经递质假说<sup>[12]</sup>认同度相对较高,DA 属于单胺神经递质的一种,存在于人体大脑皮质,中脑边缘叶系,与人的精神情绪活动密切相关。Randrup 等<sup>[13]</sup>于 1975 年第一个提出的 DA 与抑郁症发作的关系,抑郁症患者有 DA 功能障碍<sup>[14]</sup>,DA 对位于大脑海马额叶皮质的突触传递(LTP)起重要作用,可促进 LTP 对海马额叶皮质突触的可塑性<sup>[15]</sup>。假如人体内 DA 含量减少,导致突触传递中断,海马额叶皮质的突触可塑性受损,则可能出现认知障碍,进而引起抑郁症状。

百合地黄汤为张仲景的经方,由百合与生地黄组成,具有养阴清热的功效,在临床上应用广泛,可治疗抑郁症、癔病、焦虑症、失眠症等多种神经精神类疾病<sup>[16]</sup>,百合中含有大量百合总皂苷,百合总皂苷可与单胺类神经递质发挥协同作用<sup>[17]</sup>,以增加脑肽的含量,改善抑郁证患者抑郁症状。研究表明<sup>[18]</sup>,百合地黄汤可提高钠与小鼠脑内 DA 和 5-HT 的含量,有抗抑郁症的作用。

本研究中,抑郁模型组与空白组相比,抑郁模型

组大鼠行为学活动次数明显减少,血清抗炎细胞因子 IL-10 和神经递质 DA 水平明显低于其他组,提示在建立抑郁模型过程中可能抑制了 IL-10 和 DA 的释放。我们推测慢性应激抑郁模型大鼠在受到应激刺激后,细胞免疫功能下降和免疫细胞数量减少导致抗炎细胞因子 IL-10 在血清中含量降低。从而降低对 IL-2、IL-3、IFN- $\gamma$ 、THF 和 GM-CSF 等炎性细胞因子的抑制作用,以及长期的应激刺激导致大鼠脑内 DA 含量降低,大鼠海马额叶皮质突触的可塑性受损,以此推测 IL-10 的失衡和鼠脑内 DA 含量减少可能是抑郁症发生的重要原因。在本研究中,百合地黄汤低剂量组和高剂量组与抑郁模型组对比,旷场实验总分较高,强迫游泳不动时间明显缩短、血清中的抗炎因子 IL-10 和神经递质 DA 的含量均有较大幅度的提升。所以我们认为大鼠血清中抗炎因子 IL-10 和单胺类神经递质 DA 含量的增加与百合地黄汤的抗抑郁功能密不可分,这一发现为深入开发百合地黄汤药用和商业价值提供了实验依据。

#### 参考文献:

- [1] 赵敏.患者外周血中白介素-10 水平与重度抑郁症的关系研究[J].中国继续医学教育,2017,9(17):135-137.
- [2] 郑蕾,王艺明.抑郁症患者血清 IFN- $\gamma$ 、IL-10 水平与 NGF、NT-3 的相关研究[J].贵州医药,2013,37(7):592-593.
- [3] 李艺,杨欢.单胺类神经递质及其受体在抑郁症免疫失衡中的作用[J].国际免疫杂志,2008,31(3):204-208.
- [4] 傅锦华,刘勇.舒肝解郁胶囊对抑郁模型大鼠脑内 5-HT、DA 及其代谢产物水平的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(6):47-51.
- [5] 陈纪藩.金匱要略[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2011:125-126.
- [6] 应达时.舒郁颗粒对抑郁模型大鼠行为学及海马组织内 BDNF、CREB、Bcl-2 表达的影响[D].长春:长春中医药大学,2015,162-165.
- [7] 陈奇.中药药效研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,2005:182-185.
- [8] 李凡.大鼠纹状体边缘区多巴胺免疫组化研究[D].广州:南方医科大学,2003.
- [9] 李天星,陈建明,蒲晓允,等.现代临床医学免疫学检验技术[M].北京:军事医学科学出版社,2014:9,217.
- [10] FIRUS. DHABHAR, HEATHER M. BURKE, S. EPEL, et al. Low serum IL-10 concentrations and loss of regulatory association between IL-6 and IL-10 in adults with major depression[J]. Journal of Psychiatric Research, 2009,6(11):43-46.
- [11] 杨建明.血浆游离氨基酸及白细胞介素与抑郁症相关性研究[J].中国民康医学,2014,21(22):5-6.
- [12] 肖红,姚辉,侯刚.抑郁症与血浆中单胺类神经递质代谢产物[J].神经疾病与精神卫生,2002,8(4):209-210.
- [13] 王睿,黄树明.抑郁症发病机制研究进展[J].医学研究生学报,2014,32(12):1332-1336.
- [14] 易正辉,方贻儒,王祖承,等.抑郁症神经生化和神经电生理学研究进展[J].中国新药与临床杂志,2005,24(9):676-679.
- [15] 程晓娜,潘彦舒,王东辉,等.基于脑内神经递质对的拮抗关系建立新型抑郁症大鼠模型的实验研究[J].中国病理生理杂志,2017,31(6):1141-1146.
- [16] 王兮,武娉斐.百合地黄汤临床应用和实验研究进展[J].内蒙古中医药,2014,33(15):33-37.
- [17] 蒋征奎,李 晓.百合地黄汤水提物和醇提物的抗抑郁作用对比[J].中医研究,2015,41(8):55-57.
- [18] 管家齐,孙 燕,陈文东.百合地黄汤对抑郁模型小鼠脑内单胺类神经递质的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,40(9):131-133.

(本文编辑 杨 瑛)