

山奈酚对乳腺癌抑郁模型大鼠的抗抑郁作用研究

王佳^a, 谢健^{a*}, 陈岳明^b, 高力舒^a, 张海生^a(杭州市第一人民医院, a.临床心理科; b.检验科, 杭州 310006)

摘要: 目的 探讨山奈酚对实验性乳腺癌抑郁大鼠的抗抑郁作用。方法 90只大鼠随机分为对照组、乳腺癌组、抑郁组、复合模型组、氟西汀组、山奈酚组, 每组15只。通过慢性不可预知性轻度应激方法建立大鼠抑郁模型, 以二甲基苯萘为诱导剂建立乳腺癌大鼠模型。采用旷场实验垂直运动次数及水平活动总路程观察各组大鼠自主活动; 液质联检分析各组大鼠脑内海马及前额叶皮质单胺类神经递质, 包括去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、多巴胺(dopamine, DA)和5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)含量的变化。**结果** 乳腺癌组自主活动均减少, 但与对照组比较无显著性差异; 抑郁组和复合模型组自主活动减少, 与对照组比较差异均有显著性($P<0.01$); 与复合模型组相比, 山奈酚组与氟西汀组垂直运动次数及水平活动总路程均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与复合模型组比较, 氟西汀组海马区 DA、5-HT 含量显著增高($P<0.01$), 前额叶皮质 DA、NE、5-HT 浓度均显著性增高($P<0.05$); 山奈酚组与复合模型组比较, 海马部位 NE 含量明显增高($P<0.05$), 前额叶皮质部位 DA、NE、5-HT 浓度均显著性增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 山奈酚具有显著抗大鼠抑郁作用, 可能通过提高前额叶皮质部位 NE、DA、5-HT 递质水平达到抗抑郁作用。

关键词: 山奈酚; 抑郁; 乳腺癌; 单胺递质

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)03-0277-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.03.004

Antidepressant Effect of Kaempferol on Rat Complex Model of Depression and Breast Cancer

WANG Jia^a, XIE Jian^{a*}, CHEN Yueming^b, GAO Lishu^a, ZHANG Haisheng^a(Hangzhou First People's Hospital, a.Department of Clinical Psychology; b.Department of Laboratory Medicine, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the antidepressant effect of kaempferol on rat complex model of depression and breast cancer. **METHODS** The rats were randomly divided into six parts including the control group, depression model group, breast cancer model group, complex model group, fluoxetine administration group, kaempferol administration group, respectively. The rat depression model was established by the method of chronic unpredictable mild stress. The breast cancer model was induced by dimethylbenzanthracene(DMBA). The open field test was used to evaluate the autonomic activities. The LC-MS/MS method was used to assay the levels of monoamine neurotransmitters including norepinephrine (NE), serotonin (5-HT) and dopamine (DA) in the hippocampal area and the prefrontal cortex. **RESULTS** There were no significant differences in the open-field test between the cancer group and normal group, whereas the open-field activities decreased significantly in the depression model group and complex model group including horizontal movements and vertical movements with comparison to the normal group ($P<0.01$). The autonomic activities increased significantly after kaempferol administration ($P<0.01$ or $P<0.05$). The antidepressant-like effect of kaempferol was similar to fluoxetine with respect to increasing the autonomic activities. The levels of NE, DA and 5-HT in the brains of the depression model and complex model showed to decrease comparing to the control group. Whereas the levels of those in kaempferol administration group were higher than those in the complex model group. And the levels of DA, NE and 5-HT in the prefrontal cortex were significantly increased ($P<0.01$ or $P<0.05$). These changes were almost observed in fluoxetine administration group. **CONCLUSION** The study suggested that kaempferol showed antidepressant effects on rat complex model of depression and breast cancer. The underling mechanism of kaempferol antidepressant effect may be associated with increased the level of monoamine neurotransmitters in rat prefrontal lobe.

KEY WORDS: kaempferol; depression; breast cancer; monoamine neurotransmitters

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 乳腺癌患者中伴发抑郁症状的患病率为 9.4%~66.1%, 明显高于一般人群^[1], 伴发抑郁症状可使肿瘤患者的死亡率增加 25%~39%^[2]。目前肿瘤患者的抑郁

发病机制仍不清楚, 有诸多假说。主流抗抑郁药存在不良反应多、价格昂贵、患者对西药服药依从性差等弊端。中药抗抑郁, 具有多靶点、多系统调节优势, 成为近年研究热点。研究表明, 山

基金项目: 浙江省科技计划项目(2012C33005); 浙江省中医药优秀青年人才基金计划(2012ZQ020)

作者简介: 王佳, 女, 硕士, 副主任医师
(0571)56006708 E-mail: srxjian@163.com

Tel: (0571)56006708

E-mail: jia_wang@126.com

*通信作者: 谢健, 男, 主任医师

Tel:

奈酚属黄酮类黄酮醇亚属, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_6$, 广泛存在于自然界中, 具有优越的抗氧化、抗炎症和抗肿瘤生物活性, 近年研究发现其具有抗抑郁活性^[3]。然而, 目前对于其抗抑郁作用机制尚不清楚。本实验以二甲基苯蒽(DMBA)为诱导剂建立乳腺癌大鼠模型, 采用慢性不可预知性轻度应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)的方法建立大鼠抑郁模型, 以抗抑郁药氟西汀为对照组, 比较山奈酚对乳腺癌抑郁模型大鼠行为学及对脑内单胺类物质表达水平的影响。

1 材料

1.1 动物

成年 SD 大鼠 90 只, ♀, SPF 级, 许可证号: SCXK(湘)2011-0003, 购于湖南斯莱克景达有限公司, 体质量 190~210 g。食物与水充足供给, 自由摄取, 饲养室温度为 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度维持在 50%, 昼夜节律为 12 h(光照时间 7:00~19:00)。本研究对动物所有的实验操作, 均遵守中国国家科学技术委员会颁布的中华人民共和国《实验动物管理条例》。

1.2 药品与试剂

盐酸氟西汀分散片(礼来苏州制药有限公司, 批号: J20120001, 规格: 每片 20 mg); 山奈酚粉剂(浓度为 98%, 南京泽朗医药科技有限公司, 批号: ZL20131116YY)。

2 方法

2.1 动物分组

动物随机分为 6 组: 对照组(阴性对照组)、乳腺癌组(乳腺癌模型组)、抑郁组(抑郁模型组)、复合模型组(乳腺癌抑郁复合模型组)、氟西汀组(乳腺癌抑郁大鼠氟西汀治疗组)、山奈酚组(乳腺癌抑郁大鼠山奈酚治疗组), 每组 15 只。

2.2 乳腺癌大鼠模型

以 DMBA 为诱导剂, 乳腺癌组、复合模型组、氟西汀组、山奈酚组各组大鼠按 $10\text{ mg}\cdot(100\text{ g})^{-1}$ 剂量于大鼠臀部皮下一次性注射, 每组大鼠抽检 3 只活检乳腺导管上皮细胞病理学改变, 均被确认有乳腺癌发生。

2.3 乳腺癌抑郁大鼠复合模型

在大鼠乳腺癌造模接近结束前 1 周, 开始抑郁复合造模。参照 Willner 等^[4]的方法, 以 CUMS 建立抑郁动物模型。抑郁组、复合模型组、氟西汀组、山奈酚组各组大鼠在 4 周时间内接受各种

温和应激, 包括: 昼夜颠倒 24 h、电激(调电压至 45 V, 每隔 50 s 刺激 1 次, 每次刺激 10 s, 共 30 次)、禁食 24 h、禁水 24 h、热刺激(45°C 环境刺激 10 min)、倾斜 30° 过夜。每天只给予 1 种刺激因子, 且每种刺激因子累计使用 2~3 次。为避免大鼠产生适应性反应, 每种刺激因子随机给予, 使大鼠不能事先预料何种刺激的发生。

2.4 大鼠旷场实验

在实验前测试, 剔除自发活动能力差异较大的个体, 每组保留 10 只大鼠。应激开始前 1 天和应激结束后(即第 4 周)各进行一次旷场实验。实验时, 室内隔音, 将大鼠放入 $44\text{ cm}\times 44\text{ cm}\times 47\text{ cm}$ 旷场箱的中心, 测定 5 min 水平和垂直运动得分, 由于大鼠总运动距离更能客观、直接地反应动物的兴奋程度, 以大鼠总运动距离作为水平活动得分, 以两前肢离地直立的次数为垂直活动得分。

2.5 给药方法

对照组、乳腺癌组、抑郁组、复合模型组给予生理盐水; 氟西汀组于抑郁造模后 1 周给予氟西汀($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃给药, 直至造模结束; 山奈酚组于抑郁造模后 1 周开始时给予山奈酚($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃给药, 直至造模结束。

2.6 组织样品的处理

取大脑各区块组织适量, 精密称定, 加入 2 倍重量的蒸馏水, 在匀浆器中匀浆 5 min 获得均一的组织匀浆液。取组织匀浆液 $100\text{ }\mu\text{L}$, 分别加入含内标尼莫地平($40\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的乙腈溶液 0.3 mL , 涡旋混合 2 min, $13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上层澄清液置另一试管中, 在减压离心浓缩仪中挥干溶剂, 残渣加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 流动相复溶, $13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 $10\text{ }\mu\text{L}$ 进行分析。

2.7 检测仪器及色谱条件

Agilent 1260(美国 Agilent 公司); AB Sciex 4000⁺三重四级杆质谱仪(AB SCIEX 公司)。

色谱条件: ZORBAX Extend C_{18} 色谱柱 ($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$, $3.5\text{ }\mu\text{m}$, 美国 Agilent 公司); 流动相: 乙腈-水-甲酸 ($75:25:0.1$); 流速: $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 色谱柱温: 30°C ; 进样量: $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

质谱条件: 离子源为电喷雾电离源; 离子源喷射电压为 $+5.5\text{ kV}$; 温度为 550°C ; 碰撞电压(CE)分别为 9 eV [去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)], 13 eV [多巴胺(dopamine, DA)], 15 eV [5-羟色胺]

(5-hydroxytryptamine, 5-HT)]和 13 eV(IS); 扫描方式为选择离子监测(MRM), 用于定量分析的离子为 m/z 169.8 $\rightarrow$ 151.7(NE), m/z 154.1 $\rightarrow$ 136.9(DA), m/z 177.0 $\rightarrow$ 159.8(5-HT), m/z 419.5 $\rightarrow$ 343.2(IS)。

2.8 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间两两比较选择 LSD 法。

3 结果

3.1 各组大鼠旷场实验的比较

在旷场实验中, 与对照组相比, 乳腺癌组大鼠垂直运动次数及水平运动总路程略微减少, 但差异无统计学意义; 抑郁组、复合模型组大鼠均显著减少($P<0.01$)。与复合模型组相比, 山奈酚组和氟西汀组大鼠垂直运动次数及水平运动总路程显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠 Open-Field 法行为测定垂直运动和水平运动的比较($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	垂直运动次数/ 次·(5 min) ⁻¹		水平运动总路程/ mm·(5 min) ⁻¹	
	应激前	应激四周后	应激前	应激四周后
对照组	30 $\pm$ 3	29 $\pm$ 3	7 819 $\pm$ 729	7 991 $\pm$ 723
乳腺癌组	27 $\pm$ 3	18 $\pm$ 4	7 197 $\pm$ 575	5 360 $\pm$ 1 086
抑郁组	27 $\pm$ 3	9 $\pm$ 2 ¹⁾	7 885 $\pm$ 854	1 502 $\pm$ 282 ¹⁾
复合模型组	27 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2 ¹⁾	6 635 $\pm$ 600	1 002 $\pm$ 197 ¹⁾
氟西汀组	34 $\pm$ 3	21 $\pm$ 3 ³⁾	7 895 $\pm$ 814	3 624 $\pm$ 661 ¹⁾³⁾
山奈酚组	23 $\pm$ 3	17 $\pm$ 2 ¹⁾²⁾	6 587 $\pm$ 637	2 920 $\pm$ 573 ¹⁾³⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与复合模型组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with complex model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

3.2 大鼠脑组织内单胺类神经递质的含量

与对照组比较, 乳腺癌组大鼠海马部位 DA 含量明显下降($P<0.05$); 抑郁组大鼠海马及前额叶皮质部位 DA、NE、5-HT 含量明显下降($P<0.05$ 或 0.01); 复合模型组除前额叶皮质 DA 含量外, 其余均明显下降($P<0.05$ 或 0.01)。与复合模型组比较, 山奈酚组大鼠海马部位 NE 含量明显增高($P<0.05$), 前额叶皮质部位 DA、NE、5-HT 浓度明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 氟西汀组海马区 DA、5-HT 浓度显著增高($P<0.01$), 前额叶皮质 DA、NE、5-HT 浓度明显增高($P<0.05$)。结果见表 2~3, 各物质色谱图见图 1。

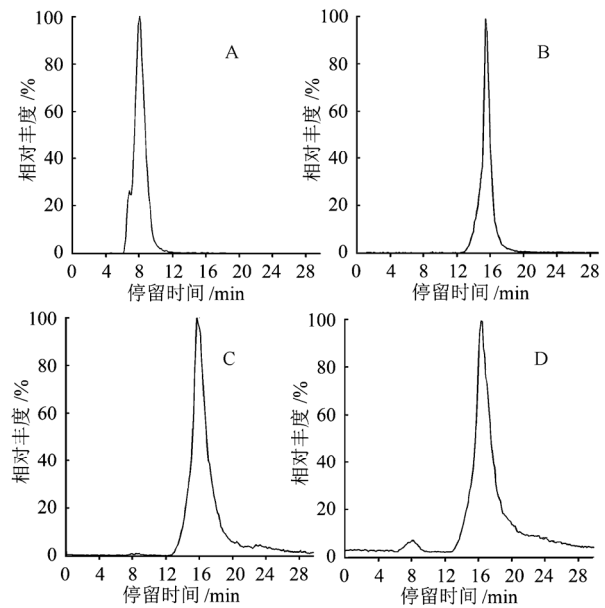


图 1 各物质色谱图
A-DA; B-NE; C-5-HT; D-尼莫地平。
Fig1 Chromatogram of substance
A-DA; B-NE; C-5-HT; D-nimodipine.

表 2 大鼠海马单胺类递质水平($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Compares of monoamine neurotransmitters levels in the hippocampus($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	DA/ng·g ⁻¹	NE/ng·g ⁻¹	5-HT/ng·g ⁻¹
对照组	240.45 $\pm$ 70.59	603.03 $\pm$ 143.08	230.55 $\pm$ 71.06
乳腺癌组	205.75 $\pm$ 23.95 ¹⁾	519.45 $\pm$ 85.86	209.65 $\pm$ 30.87
抑郁组	162.87 $\pm$ 41.36 ²⁾	475.20 $\pm$ 142.43 ¹⁾	192.75 $\pm$ 28.12 ¹⁾
复合模型组	186.78 $\pm$ 34.54 ²⁾	462.99 $\pm$ 88.28 ²⁾	187.44 $\pm$ 49.02 ¹⁾
氟西汀组	262.32 $\pm$ 37.98 ⁴⁾	501.06 $\pm$ 60.93 ²⁾	250.14 $\pm$ 46.66 ⁴⁾
山奈酚组	215.91 $\pm$ 40.32	571.23 $\pm$ 81.32 ³⁾	219.54 $\pm$ 31.36

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与复合模型组相比, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with complex model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

表 3 大鼠前额叶皮质单胺类递质水平($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Compares of monoamine neurotransmitters levels in the prefrontal cortex($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	DA/ng·g ⁻¹	NE/ng·g ⁻¹	5-HT/ng·g ⁻¹
对照组	210.24 $\pm$ 33.27	534.24 $\pm$ 83.27	237.30 $\pm$ 64.47
乳腺癌组	228.18 $\pm$ 38.60	542.61 $\pm$ 57.96	209.70 $\pm$ 32.83
抑郁组	160.67 $\pm$ 21.38 ¹⁾	435.40 $\pm$ 59.89 ¹⁾	182.07 $\pm$ 52.88 ¹⁾
复合模型组	213.42 $\pm$ 39.34	428.10 $\pm$ 90.78 ¹⁾	206.52 $\pm$ 23.77 ¹⁾
氟西汀组	242.16 $\pm$ 17.48 ²⁾	552.96 $\pm$ 111.31 ²⁾	238.59 $\pm$ 35.61 ²⁾
山奈酚组	248.16 $\pm$ 32.43 ²⁾	520.83 $\pm$ 58.50 ²⁾	240.39 $\pm$ 24.36 ³⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与复合模型组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with complex model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

4 讨论

抑郁症脑内单胺类神经递质系统功能失衡, 不仅仅是其浓度的改变, 同时也是其相关受体数

量、密度、功能、受体后信号转导及基因转录过程的一系列改变。而肿瘤患者的抑郁症状，其病因可能更为复杂。其中，较被认同的有“细胞因子学说”，认为细胞因子可能在肿瘤患者抑郁障碍的病理生理机制中起重要作用。Pyter 等^[5]对 NMU 诱导的乳腺癌大鼠进行研究，发现大鼠在瘤体形成后表现出抑郁样行为，且海马中细胞因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IL-10)浓度升高，提出肿瘤发生后细胞因子浓度变化导致抑郁样的情绪行为。本研究发现乳腺癌大鼠自主活动减少，但与对照组比较并无显著性差异，且海马组织及前额叶皮质神经递质浓度亦无明显差异，推测其自主活动减少与肿瘤所致虚弱有关，而并非抑郁症状。

本研究发现山奈酚能改善抑郁大鼠自主活动，具有抗抑郁作用，可能与提高前额叶皮质 DA、NE、5-HT 含量有关。笔者另一项研究显示^[6]，罗布麻叶总黄酮提取物在抑郁模型大鼠中，预防组较治疗组有更显著抗抑郁疗效，并且能显著提高海马组织 5-HT 浓度，而治疗组无这种显著变化。本研究发现山奈酚治疗组亦不能显著增加海马组织 5-HT 含量，推测抗抑郁治疗过程中，前额叶皮质神经递质浓度可能早于海马组织 5-HT 浓度发生变化，或者海马组织的神经递质浓度下降更难逆转，而早期干预可能有助于这种逆转。该结果符合目前神经生化及影像学研究发现，抑郁症患者有海马神经缺失或萎缩，未治疗的时间与海马体积缩小呈正相关，早期、积极治疗将有助于神经修复^[7]，海马体积小似乎能预测抗抑郁治疗起效更

慢以及更难达到临床治愈^[8]。

研究发现山奈酚可通过抑制肿瘤血管形成、诱导肿瘤细胞凋亡、阻止肿瘤的浸润转移过程产生抗肿瘤作用^[9]，对于肿瘤伴发抑郁患者具有一定优势。

REFERENCES

- [1] MAASS S W, ROORDA C, BERENDSEN A J, et al. The prevalence of long-term symptoms of depression and anxiety after breast cancer treatment: A systematic review [J]. *Maturitas*, 2015, 82(1): 100-108.
- [2] SATIN J R, LINDEN W, PHILLIPS M J, et al. Depression as a predictor of disease progression and mortality in cancer patients: a meta-analysis [J]. *Cancer*, 2009, 115(22): 5349-5361.
- [3] CALDERON-MONTANO J M, BURGOS-MORON E, PEREZ-GUERRERO C, et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11(4): 298-344.
- [4] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic mild unpredictable stress and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology*, 1987, 93(3): 358-364.
- [5] PYTER L M, PINEROS V, GALANG J A, et al. Peripheral tumors induce depressive-like behaviors and cytokine production and alter hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2009, 106(22): 9069-9074.
- [6] 王佳, 谢健, 陈岳明, 等. 罗布麻叶总黄酮提取物对抑郁模型大鼠抗抑郁作用的研究[J]. *浙江医学*, 2016, 38(1): 14-16.
- [7] SHELIN Y I, GADO M H, KRAEMER H C. Untreated depression and hippocampal volume loss [J]. *Am J Psychiatry*, 2003, 160(8): 1516-1518.
- [8] SHELIN Y I, DISABATO B M, HRANILOVICH J, et al. Treatment course with antidepressant therapy in late-life depression [J]. *Am J Psychiatry*, 2012, 169(11): 1185-1193.
- [9] WANG Z W, DABROSIN C, YIN X, et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 35(Supplement): S224-S243.

收稿日期: 2015-06-28

PSORI-CM01 方对银屑病样豚鼠模型的影响及其对大鼠活血作用研究

刘丽娟, 赵瑞芝, 卢传坚^{*}(广州中医药大学第二附属医院, 广州 510120)

摘要: 目的 观察 PSORI-CM01 方对类银屑病豚鼠模型、血瘀证大鼠的影响, 考察该方抗银屑病及活血化瘀效果。方法 采用普萘洛尔诱导豚鼠耳廓类银屑病皮损模型和肾上腺素结合冰水浸泡建立大鼠血瘀证模型, 将动物随机分为正常对照组、模型组、PSORI-CM01 方低、中、高剂量组、阳性药组, 灌胃给药, 正常对照组及模型组给予等容积纯净水, 豚鼠处死后, 取双耳制备病理切片, 评价 PSORI-CM01 方抗银屑病效果; 血瘀模型大鼠腹主动脉采血检测血液流变学相关指标, 评价 PSORI-CM01 方活血化瘀效果。**结果** PSORI-CM01 方可显著减少豚鼠银屑病样模型的耳廓皮肤厚度, 降低银

基金项目: 广东省自然科学基金研究团队项目(S2013030011515); 广东省科技厅-广东省中医药科学院联合科研专项项目(2011B032200009); 广东省中医院项目(YK2013B1N11)

作者简介: 刘丽娟, 女, 硕士, 实习研究员 Tel: 18820143936 E-mail: llj.82@163.com ^{*}通信作者: 卢传坚, 女, 博士, 教授, 博导 Tel: (020)81887233-31223 E-mail: luchuanjian888@gzhtcm.edu.cn