

[文章编号] 1000-4718(2017)03-0435-09

N-棕榈酰乙醇胺对慢性束缚应激小鼠 焦虑抑郁样行为的影响*

李苗苗¹, 王丹¹, 毕文鹏¹, 宋灵云², 于海玲^{1△}
(延边大学¹医学院, ²药学院, 吉林 延吉 133002)

[摘要] 目的: 采用慢性束缚应激小鼠模型, 研究 *N*-棕榈酰乙醇胺(*N*-palmitoylethanolamide, PEA) 对小鼠焦虑抑郁样行为的影响, 进一步探讨 PEA 抗小鼠焦虑抑郁作用的可能机制。方法: 小鼠分为正常对照组、模型组、氟西汀(10 mg/kg) 组和 PEA 2.5、5、10 mg/kg 组, 每天灌胃给药后 30 min 将小鼠(除了正常对照组) 放置于有机玻璃管内接受 4 h 的慢性束缚应激, 持续 21 d。第 22 天采用旷场实验和强迫应激实验观察 PEA 对慢性束缚应激小鼠抑郁样行为的影响; 高架十字迷宫实验探讨 PEA 对慢性束缚应激小鼠焦虑样行为的影响; 水迷宫方法分析 PEA 对慢性束缚应激小鼠学习、记忆、空间定向和认知功能等方面的作用; ELISA 方法检测慢性束缚应激小鼠血清促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、皮质醇(cortisol, CORT) 及海马 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT) 含量的变化; 可见分光光度法检测海马乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE) 活性的改变。结果: 与模型组相比, 在小鼠强迫应激实验中, PEA 及氟西汀组小鼠不动时间明显减少; 旷场试验中, PEA 及氟西汀明显增加小鼠水平移动距离及运动总时间, 但只有 PEA 10 mg/kg 及氟西汀组增加了小鼠直立次数; 在高架十字迷宫实验中, PEA 及氟西汀明显增加小鼠开臂进入次数、开臂停留时间百分比及在臂总移动距离; 在水迷宫实验中, PEA 5、10 mg/kg 及氟西汀组明显缩短小鼠寻台潜伏期, PEA 10 mg/kg 及氟西汀组明显缩短小鼠搜寻距离。与应激模型组比较, PEA 2.5~10 mg/kg 及氟西汀显著降低小鼠血清中 ACTH 水平, PEA 5、10 mg/kg 及氟西汀显著降低小鼠血清 CORT 水平及小鼠肾上腺指数, PEA 10 mg/kg 及氟西汀显著增高海马 5-HT 含量, 降低海马 AChE 活性, 但 PEA 2.5 和 5 mg/kg 组海马组织中 5-HT 含量及 AChE 活性则无明显改变。结论: PEA 对束缚应激模型小鼠的焦虑及抑郁样行为具有一定的拮抗作用, 其具体作用机制可能与调节下丘脑-垂体-肾上腺轴功能、增加海马单胺类递质 5-HT 水平及参与中枢胆碱系统的调节有关。

[关键词] *N*-棕榈酰乙醇胺; 束缚应激; 焦虑; 抑郁

[中图分类号] R363; R749

[文献标志码] A

doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2017.03.009

Effects of *N*-palmitoylethanolamide on anxiety- and depression-like behaviors in mice induced by chronic restraint stress

LI Miao-miao¹, WANG Dan¹, BI Wen-peng¹, SONG Ling-yun², YU Hai-ling¹

(¹College of Medicine, ²College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China. E-mail: hlyu@ybu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effects of *N*-palmitoylethanolamide (PEA) on the anxiety- and depression-like behaviors of the mouse model induced by restraint stress, and to explore the possible mechanism of anxiolytic and antidepressant effects of PEA. **METHODS:** The mice were intragastrically treated with 2.5, 5 and 10 mg/kg of PEA for 21 consecutive days once daily. Thirty min after intragastric administration, the mice (except the normal control group) were placed in the glass tube to accept 4-h chronic restraint stress for 21 d. After the last administration, the mice were submitted to the forced stress test and the open field test (OFT) to observe the effects of PEA on the depression-like behaviors. The cumulative immobility time was recorded during the 4-min interval in the forced swimming test (FST) or during the 5-min interval in the tail suspension test (TST). The elevated plus maze (EPM) test was used to investigate the effect of PEA on the mouse anxiety-like behaviors, and the water maze method was used to investigate the learning and memory abilities, spatial orientation and cognitive function of mice. After the behavior tests, the serum was collected and the hippocampus was removed. The serum contents of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol (CORT) and 5-

[收稿日期] 2016-10-29 [修回日期] 2016-12-22

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81460217)

△通讯作者 Tel: 0433-2435153; E-mail: hlyu@ybu.edu.cn

hydroxytryptamine (5-HT) in the hippocampus were detected by ELISA. The changes of acetylcholinesterase (AChE) activity in the hippocampal homogenate was measured by spectrophotometry. **RESULTS:** Compared with model group, in the FST or TST, the immobility time in the mice treated with PEA at 2.5 ~ 10 mg/kg and fluoxetine was significantly reduced. In the OFT, the total locomotion distance and total movement time were increased significantly in the mice, but only 10 mg/kg PEA and fluoxetine increased the numbers of rearing. In the EPM test, the percentage of the time spent in open arms, the entries into open arms and the total locomotion distance in 4 arms in the mice were significantly increased. In water maze test, PEA at 5 and 10 mg/kg and fluoxetine significantly shortened the latency to find the security zone in the mice, and PEA at 10 mg/kg and fluoxetine obviously shorten the swimming distance. Compared with model group, PEA at 10 mg/kg and fluoxetine reduced the mouse serum levels of ACTH and CORT, and the adrenal index, increased the 5-HT content and decreased the AChE activity in the hippocampus. **CONCLUSION:** PEA produces antagonistic effects on anxiety- and depression-like behaviors in the mice induced by restraint stress. Its specific mechanism may be related to the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis function by increasing the 5-HT level in hippocampus, thus participating in the regulation of central cholinergic system.

[KEY WORDS] N-palmitoylethanolamide; Restraint stress; Anxiety; Depression

焦虑和抑郁症是两种最常见的慢性病,属于精神系统疾病^[1]。抑郁症患者通常表现出显著而持久性心境低落、思维迟缓和意志活动降低。焦虑症是指在缺乏相应的客观因素情况下,表现为顾虑重重、紧张恐惧,伴有心悸、出汗、手抖、尿频等自主神经功能紊乱症状。近期研究表明,焦虑障碍与抑郁障碍的共病在临床上非常普遍,具有症状明显、病程多迁延易反复、社会功能损害、出现自杀观念及行为、预后差等特征。抑郁症的患者常伴有焦虑症状,焦虑又可加重抑郁的症状。但目前常用的选择性5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)再摄取抑制剂类抗抑郁药对顽固的抑郁症尚不能达到满意疗效,且存在副作用,故研究和开发更高效的抗抑郁药物一直是近些年研究的热点。

N-棕榈酰乙醇胺(N-palmitoylethanolamide, PEA)作为内源性大麻素类似物,属于内源性脂肪酸乙醇胺家族(结构见图1),具有抗炎^[2]、镇痛^[3]、抗惊厥、抗癫痫作用^[4]和其它神经活性^[5]。PEA在中枢神经系统内广泛分布,多由神经元和神经胶质细胞分泌,其抗痛觉过敏和神经保护特性主要与神经元活动的减少相关。越来越多的证据表明,PEA可能在中枢神经系统神经退行性疾病中发挥神经保护作用^[6],特别是在周围神经病变模型中^[7]。近年来生理学及药理学对PEA作用的研究日渐增加。Cordaroa等^[3]研究发现,静脉注射PEA可以预防糖尿病大鼠的肾功能不全和改善肾切除手术后造成的生化指标紊乱。在小鼠福尔马林疼痛实验中,PEA和反胺苯环醇联合应用可以增强单独应用时的镇痛效果^[8]。在本实验室的前期研究中也发现PEA在小鼠强迫游泳和悬尾实验中均表现出明显的抗抑郁作用^[9]。

为了进一步探讨PEA对束缚应激小鼠的抗焦虑

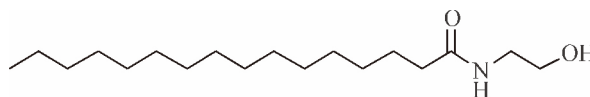


Figure 1. The structure of N-palmitoylethanolamide.

图1 N-棕榈酰乙醇胺结构图

及抗抑郁作用,本研究采用两种经典的小鼠强迫应激模型(悬尾实验和强迫游泳实验)以及旷场实验,探讨PEA对束缚应激模型小鼠的抗抑郁作用;采用高架十字迷宫实验探讨PEA对束缚应激小鼠的抗焦虑作用;采用水迷宫方法分析PEA对小鼠学习、记忆等方面的影响。我们还采用生化实验方法检测小鼠血清中促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)和皮质醇(cortisol, CORT)水平以及海马中5-HT含量,探讨PEA是否通过调节下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA轴)以及经典单胺类神经递质5-HT含量,改善束缚应激引发的焦虑抑郁样症状,从而发挥其潜在的抗焦虑、抗抑郁作用;另外采用分光光度法检测海马乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)含量的变化,以分析PEA对小鼠学习记忆的影响是否与其改变AChE的活性有关,以进一步探讨PEA在改善小鼠束缚应激中的作用机制。

材 料 和 方 法

1 动物

健康雄性清洁级昆明种小鼠,体重20~24g,延边大学实验动物中心提供,合格证号为SCXK(吉2011-0007)。动物经适应性喂养3d后,随机分组,自由摄食和饮水,自然光照,在温、湿度恒定[室温(23±2)℃,相对湿度(55±5)%]的清洁空调室内饲养。每笼5只。行为学实验于上午9:00~11:00之间,各实验组在安静温暖的环境中,平行进行。

2 主要药品与仪器

2.1 药品与试剂 受试化合物 PEA 其结构式见图 1 延边大学药学院提供; 氟西汀(fluoxetine) 购自上海中西制药有限公司; 羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethyl cellulose) 购自沈阳化学试剂厂; 小鼠 ACTH 和 CORT 酶联免疫试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司); 小鼠 5-HT 酶联免疫试剂盒(上海酶联生物技术有限公司); BCA 法总蛋白测定试剂盒和 AChE 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。PEA 和氟西汀均于实验前用 0.3% 羧甲基纤维素钠配置成混悬溶液备用, 药物均按动物每公斤体重给予。

2.2 实验仪器 TST-400 小鼠悬尾实验视频分析系统和 TM-Vision 行为学实验系统(成都泰盟软件有限公司); DW-2102A 酶联免疫检测仪(北京六一生物科技有限公司); UV-5800 可见分光光度计(上海元析仪器有限公司); DW-40L262 医用低温保存箱(青岛海尔特种电器有限公司)。

3 方法

3.1 动物分组及模型制备 60 只小鼠适应性饲养 3 d 后, 按体重随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组(氟西汀 10 mg/kg) 和 PEA(2.5、5 和 10 mg/kg) 剂量组, 每组 10 只, 每天上午 8:00 ~ 9:00 灌胃给药, 灌胃 0.5 h 后, 除正常对照组小鼠外, 其它小鼠接受 4 h 的慢性束缚应激, 持续 21 d。慢性束缚应激模型制备方法为将小鼠放置在有机玻璃制成的束缚管内, 其长度和直径分别是 25 和 2.5 cm, 束缚管表面设小孔以确保通风良好。小鼠在束缚管内有限的空间活动, 但不会造成肉眼可见的躯体上的伤害。在此阶段, 小鼠禁食水直至应激完成。

3.2 旷场实验(open field test ,OFT) 实验装置由旷场反应箱以及数据自动采集和处理系统两部分组成。OFT-400 实验系统是一个不透明的塑料容器(625 mm × 740 mm × 510 mm), 实验区的体积是 525 mm × 525 mm × 415 mm。底面被分为 25 个区域, 实验全程由计算机控制并记录。动物活动性被 TM-Vision 行为学实验系统检测, 全程由敞箱上方摄像机录制, 其视野可覆盖整个敞箱。在实验过程中, 实验区分为 4 个区域: 四边、四角、四周和中央区域, 每只小鼠被单独放置在实验区的中心, 记录 3 min 内的实验数据。实验者将动物轻柔地置于实验区中央, 在实验间歇期, 实验器材四壁和底面均用 10% 乙醇擦拭, 以避免对下只小鼠的影响。

3.3 悬尾实验(tail suspension test ,TST) 小鼠悬尾实验的活动性由 TST-400 悬尾视频分析软件测试。

悬尾实验参照 Steru 等的方法^[10-11], 实验装置有 6 个活动区域, 以确保实验平行进行, 实验者用医用胶带在距小鼠尾尖 2 cm 处粘贴, 沿附固定杆方向进行粘贴固定, 将固定磁铁吸附于小鼠活动箱通道顶部, 小鼠倒置悬挂在活动箱空间内, 确保小鼠头部距底面 5 cm。实验在安静、微光的室内进行, 全程由摄像机记录, 实验者可以观察小鼠挣扎反应强度并通过计算机记录小鼠累计不动时间。

3.4 强迫游泳实验(forced swimming test ,FST) 强迫游泳测试实验方法参照 Porsolt 等^[12] 和本研究室以前的方法^[11], 以小鼠累计不动时间作为小鼠抑郁状态评估^[13-14]。实验中, 小鼠被单独放入一个透明的玻璃容器(高 22 cm, 直径 14 cm), 水深 10 cm, 水温(25 ± 0.5) °C, 测试环境保持安静, 各受试组平行测量, 小鼠自由游泳, 当小鼠头露出水面呈漂浮状态而不尽力寻求逃脱, 反映了其绝望和无助状态^[15], 测试时间为 6 min, 观察后 4 min 内小鼠累计不动时间。

3.5 高架十字迷宫(elevated plus maze ,EPM) 实验 装置由高架台和 TM-Vision 行为学实验系统两部分组成。该装置分为 2 个开臂和 2 个闭臂, 距底面高度为 100 cm, 小鼠被单独放入中心区, 面向闭臂。测试全程保持环境安静, 微光下进行, 实验过程由摄像头记录, 当小鼠四肢都进入开臂或闭臂时数据才能被记录。为排除人为因素, 实验者盲选动物, 实验测试时间为 3 min。每只小鼠测试后, 均用 10% 乙醇擦拭设备, 以避免上一只小鼠留下的气味对下一只受试小鼠的影响。计算动物在开臂停留时间百分比和开臂进入次数百分比。

3.6 水迷宫(water maze) 实验 装置由水迷宫设备和 TM-Vision 行为学实验系统两部分组成。在正式实验前, 小鼠经过 2 d 的低难度训练。第 3 天, 每只小鼠接受 3 min 测试, 由摄像机记录小鼠找到安全区域所需时间和运动距离, 进行统计学分析。每只小鼠在接受测试后用干毛巾擦拭身体并置于安静温暖环境中。

3.7 生化检测标本制备 最后一次行为学检测结束后 1 h, 断头取血, 分离血清; 快速取脑, 冰上分离双侧海马; 开腹摘取肾上腺、称重, 标本于 -80 °C 保存备用。

3.8 ACTH、CORT 和 5-HT 的测定 小鼠血清 ACTH 和 CORT 以及海马 5-HT 检测均采用酶联免疫试剂盒。实验方法参照使用说明书, 具体操作步骤如下: 稀释标准品, 具体检测孔包括标准孔、样本孔和空白孔, 添加 100 μL 辣根过氧化物酶, 37 °C 孵育 30 min, 洗涤液每孔洗涤 5 次, 最后 1 次洗后, 拍干剩余清洗液, 分别将 50 μL 显色剂 A 和显色剂 B 加入

孔中 轻轻晃动混匀 37 °C 避光显色 15 min ,加入终止液 50 μL ,空白孔调零 ,终止液加入后 15 min 450 nm 测定吸光度值。血清 ACTH 和 CORT 分别以 ng/L 和 μg/L 表示。5-HT 含量用 ng/g 海马组织蛋白表示。

3.9 AChE 活性的测定 海马 AChE 的活性根据 AChE 试剂盒使用说明书 ,以可见分光光度法 ,在波长 412 nm 处 0.5 cm 光径下检测其吸光度值 ,计算小鼠海马 AChE 的活性 ,单位以 ×10³ U/g 海马组织蛋白表示。

4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学处理。数据均以均数 ± 标准误 (mean ± SEM) 表示 ,多组间比较用单因素方差分析和 Bonferroni 多重检验 ,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 PEA 对强迫应激小鼠不动时间的影响

在连续用药 21 d 后 ,由图 2 可见 ,束缚应激模型组与正常对照组相比 ,小鼠悬尾不动时间及强迫游泳不动时间均明显延长 (P < 0.01) ;与模型对照组比较 ,PEA 5、10 mg/kg 和氟西汀组小鼠悬尾不动时间减少 32%、35% 和 29% (P < 0.05) ,强迫游泳不动时间减少 33%、39% 和 35% (P < 0.05) ,PEA 2.5 mg/kg 组小鼠的强迫游泳不动时间减少 29% (P < 0.05) ,但此剂量组小鼠的悬尾不动时间则无明显改变。

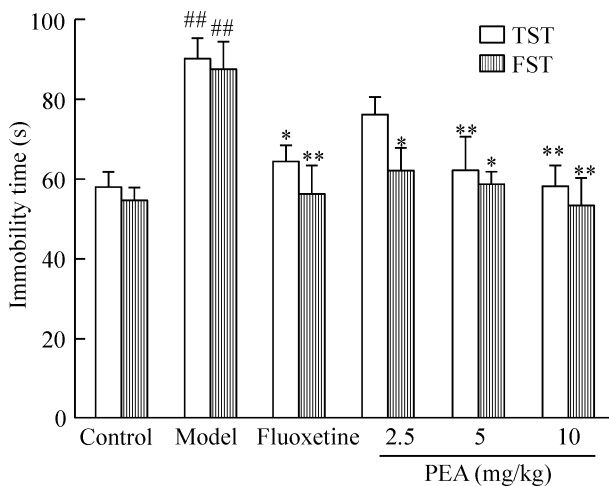


Figure 2. The effect of PEA on immobility time in tail suspension test (TST) and forced swimming test (FST) in the mice. Mean ± SEM. n = 10. * P < 0.05 , ** P < 0.01 vs model group; ^{###} P < 0.01 vs control group.

图 2 强迫应激实验行为学结果

2 PEA 对小鼠旷场实验行为的影响

在连续用药 21 d 后 ,束缚应激模型组小鼠与正常对照组相比 ,水平移动总距离及运动总时间 ,直立次数均明显减少 (P < 0.05) ;与模型对照组比较 ,PEA 2.5、5、10 mg/kg 和氟西汀均明显增加小鼠的水平移动总距离和运动总时间 (P < 0.05) ,但只有 PEA 10 mg/kg 及氟西汀增加了小鼠直立次数 (P < 0.05) ,见图 3。

3 PEA 对高架十字迷宫实验小鼠行为学的影响

如图 4 显示 ,束缚应激模型组小鼠与正常对照组比较 ,开臂停留时间百分率及开臂进入次数百分率均明显缩短 (P < 0.01) ;与模型对照组比较 ,PEA 2.5、5、10 mg/kg 和氟西汀组小鼠开臂进入次数百分比明显延长 (P < 0.05) ,PEA 5、10 mg/kg 和氟西汀组小鼠开臂停留时间百分率明显延长 (P < 0.05) ,而 PEA 2.5 mg/kg 组小鼠开臂停留时间百分率与模型组相比无明显差异 ,但与正常对照组相比却明显缩短 (P < 0.05) ,说明 PEA 2.5 mg/kg 剂量组无明显改变小鼠开臂停留时间百分率作用。与模型对照组相比 ,PEA 5、10 mg/kg 和氟西汀明显延长小鼠在十字迷宫总在臂移动距离 (P < 0.05) 。

4 PEA 对水迷宫实验小鼠行为学的影响

图 5 显示 ,束缚应激模型组小鼠与正常对照组比较 ,水迷宫实验中的逃逸潜伏期及总游泳距离均明显延长 (P < 0.01) ;与模型对照组比较 ,PEA 5、10 mg/kg 和氟西汀组小鼠逃逸潜伏期明显缩短 (P < 0.05) ,PEA 10 mg/kg 和氟西汀组小鼠总游泳距离明显缩短 (P < 0.05) 。

以上行为学结果提示 PEA 2.5 ~ 10 mg/kg 剂量组可以一定程度地改善小鼠的焦虑和抑郁症状 ,且存在一定的量效关系。

5 PEA 对束缚应激小鼠肾上腺指数的影响

由图 6 显示 ,束缚应激模型组小鼠与正常对照组比较 ,肾上腺指数明显增加 (P < 0.01) ;与模型对照组比较 ,PEA 5、10 mg/kg 和氟西汀组小鼠的肾上腺指数明显降低 (P < 0.05) 。

6 PEA 对束缚应激小鼠 ACTH 和 CORT 的影响

表 1 结果显示 21 d 的束缚应激后模型组小鼠与正常对照组比较 ,小鼠血清 ACTH 和 CORT 水平均明显增高 (P < 0.01) ;与应激模型组比较 ,PEA 2.5、5、10 mg/kg 和氟西汀组小鼠血清 ACTH 水平显著降低 (P < 0.05) ,PEA 5、10 mg/kg 和氟西汀组小鼠血清 CORT 水平显著降低 (P < 0.05) 。

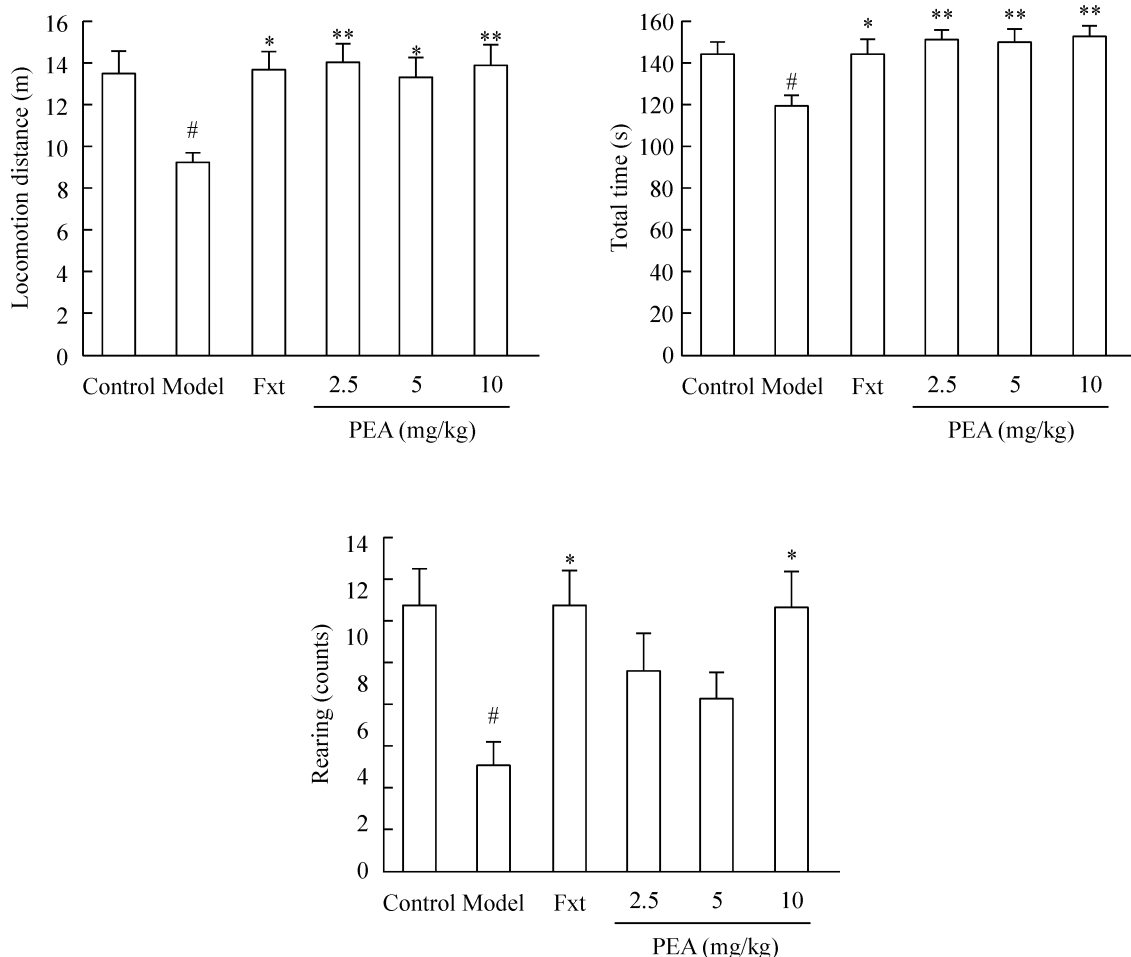


Figure 3. The effect of PEA on the open field test in the mice. Fxt: fluoxetine. Mean \pm SEM. $n = 10$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs control group.

图3 旷场实验行为学结果

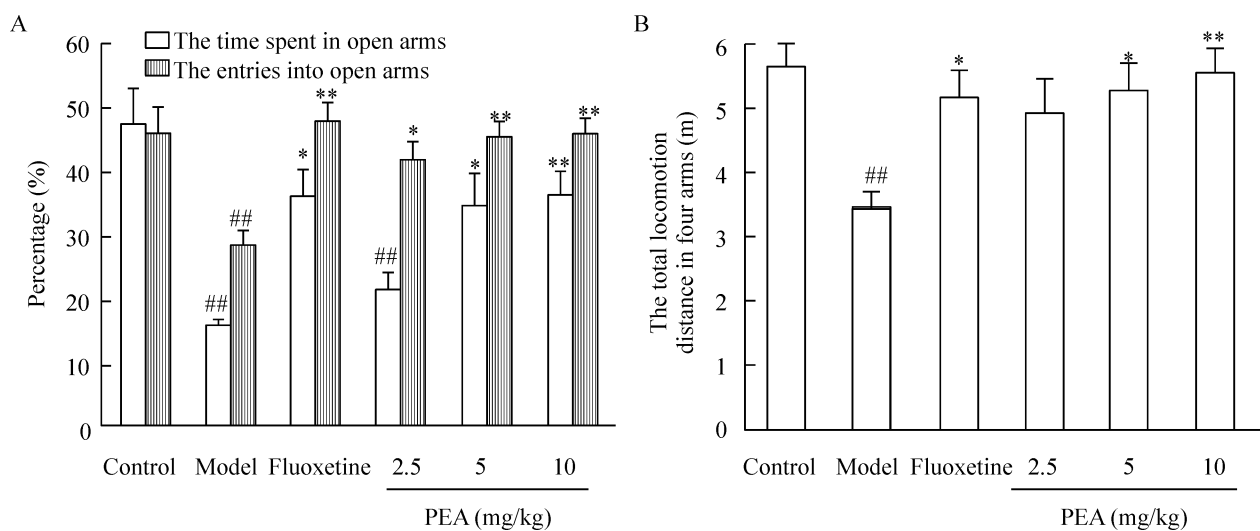


Figure 4. The effect of PEA on the elevated plus maze test in the mice. A: the percentages of the time spent in open arms and the entries into open arms; B: the total distance of mouse movements in four arms. Mean \pm SEM. $n = 10$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; ^{##} $P < 0.01$ vs control group.

图4 高架十字迷宫实验行为学结果

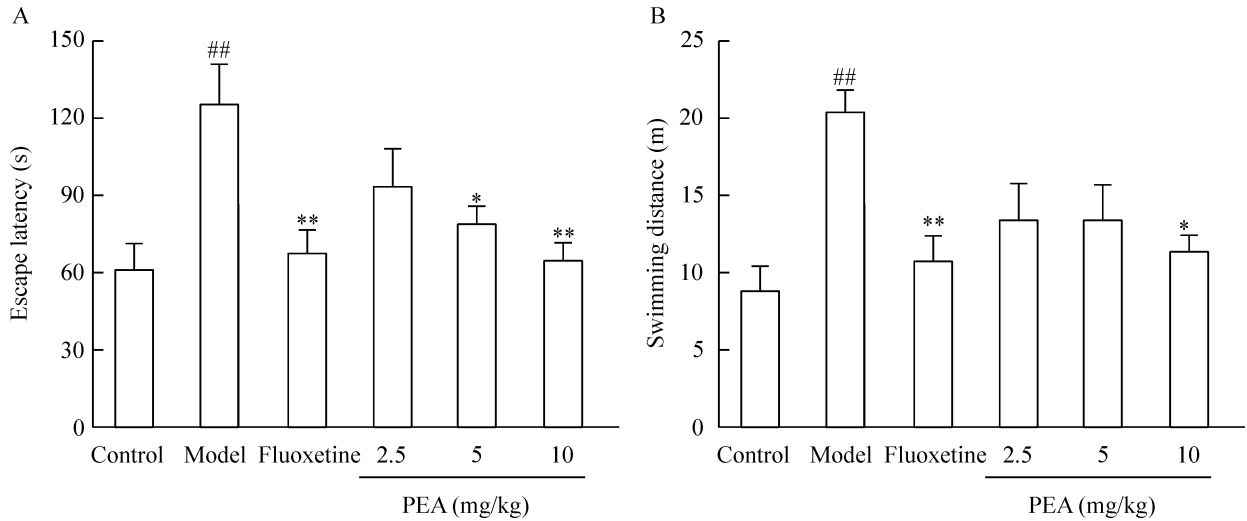


Figure 5. The effect of PEA on the water maze test in mice. A: the escape latency; B: the total swimming distance. Mean \pm SEM. $n = 10$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; ## $P < 0.01$ vs control group.

图5 水迷宫实验行为学结果

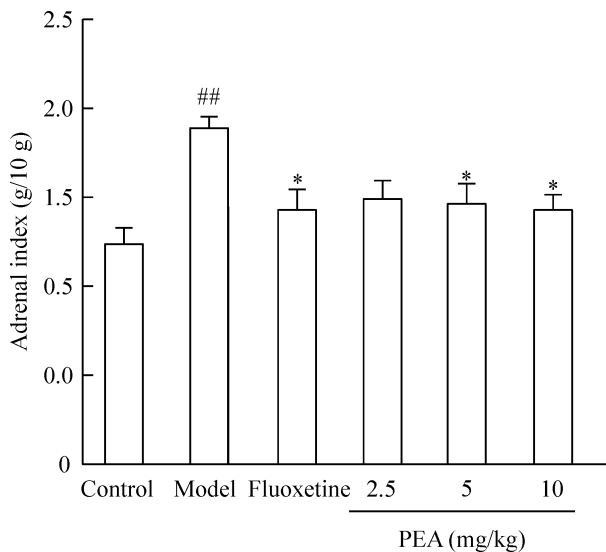


Figure 6. The effect of PEA on the changes of mouse adrenal index. Mean \pm SEM. $n = 10$. * $P < 0.05$ vs model group; ## $P < 0.01$ vs control group.

图6 小鼠肾上腺指数实验结果的比较

表1 血清 ACTH 和 CORT 含量测定结果的比较

Table 1. The effects of PEA on serum ACTH and CORT levels after 21 d of stress and drug treatment (Mean \pm SEM. $n = 8$)

Group	Dose (mg/kg)	ACTH (ng/L)	CORT (μ g/L)
Control	-	147.72 \pm 9.96	424.28 \pm 33.82
Model	-	197.84 \pm 10.91 ^{##}	573.27 \pm 25.61 ^{##}
Fluoxetine	10	149.71 \pm 5.01 [*]	441.57 \pm 17.03 ^{**}
PEA	2.5	155.09 \pm 11.29 [*]	485.37 \pm 28.46
	5	148.90 \pm 8.90 ^{**}	459.07 \pm 26.61 [*]
	10	150.38 \pm 8.46 ^{**}	441.77 \pm 16.08 ^{**}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; ## $P < 0.01$ vs control group.

7 PEA 对束缚应激对小鼠 5-HT 含量和 AChE 活性的影响

由表 2 显示 21 d 的束缚应激后模型组小鼠与正常对照组比较,海马 5-HT 含量降低 ($P < 0.01$), AChE 活性增高 ($P < 0.05$);与应激模型组比较,PEA 10 mg/kg 和氟西汀组小鼠海马 5-HT 水平显著增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),AChE 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

表2 海马 5-HT 含量和 AChE 活性的测定结果

Table 2. The effects of PEA on 5-HT level and AChE activity in the hippocampus after 21 d of stress and drug treatment (Mean \pm SEM. $n = 8$)

Group	Dose (mg/kg)	5-HT (ng/mg protein)	AChE (U/mg protein)
Control	-	1.21 \pm 0.08	17.79 \pm 1.08
Model	-	0.81 \pm 0.03 ^{##}	24.11 \pm 1.81 [#]
Fluoxetine	10	1.17 \pm 0.07 ^{**}	19.44 \pm 1.34 [*]
PEA	2.5	0.86 \pm 0.06 [#]	23.61 \pm 1.56
	5	1.05 \pm 0.08	20.28 \pm 1.01
	10	1.15 \pm 0.07 [*]	19.30 \pm 1.05 [*]

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control group.

讨 论

近年来研究发现,应激和抑郁症密切相关。慢性、低强度、长期的应激源是促进抑郁发生、加速抑郁症发展的主要原因。应激动物模型通常被用在抑郁症的病理生理机制研究和抗抑郁药物筛选等方面^[16]。慢性束缚应激模型是抑郁症常用的应激模型,具有可操作性强、重复性好的特点,其作为一种

对机体无损伤性刺激,且能够模拟抑郁症的核心症状(快感缺乏),被广泛应用于抑郁症机制研究和药物筛选模型的制备^[17]。若抑郁症或焦虑症发生,动物行为会表现为抑制状态,机体出现神经-内分泌系统紊乱、神经递质失衡,而抗抑郁药可缓解或逆转此类症状。

小鼠 TST 和 FST 是评价抗抑郁药物的两种经典动物模型,在动物无法摆脱环境刺激而导致绝望行为时,给予抗抑郁药物可使其累积不动时间减少。本实验结果显示,慢性束缚应激 21 d 后,模型组小鼠累计不动时间明显延长,连续灌胃给药 21 d 后,受试化合物 PEA 2.5 ~ 10 mg/kg 及阳性对照药氟西汀 10 mg/kg 组小鼠表现为累计不动时间显著减少,且 PEA 10 mg/kg 组小鼠不动时间的减少程度明显强于氟西汀 10 mg/kg 剂量组,说明 PEA 对于慢性束缚应激诱导的小鼠抑郁样行为具有改善作用,且效果优于等剂量的氟西汀。

OFT 通常被用来探究实验动物在新异环境中的自发活性、探索性行为、抑郁样行为和对新环境的警觉性,能够反映中枢神经系统的兴奋性^[18]。OFT 实验中的直立次数、静止时间和运动距离反映动物的活动性及其探索行为。EPM 被用来评价小鼠焦虑样行为,这是对于探究-回避冲突产生的条件性应答,与小鼠大脑边缘区、海马、杏仁核、中缝背核等脑区密切相关^[19]。焦虑行为产生下,小鼠进入开放臂的次数和时间均明显多于封闭臂,而抗焦虑药能明显逆转此状况,使动物进入开放臂的次数和时间增加。通过计算动物在开臂停留时间百分比和开臂进入次数百分比以评价抗焦虑抑郁药的作用,两者均升高表示该药物具有抗焦虑样作用^[20]。

慢性束缚应激 21 d 后,OFT 实验中模型组小鼠总运动时间和总运动距离均显著减少,表明小鼠活动迟缓,自主活动性降低;其直立次数减少说明小鼠对于外界的探索意识降低。EPM 实验中,模型组小鼠开臂/在臂进入次数百分比,开臂/在臂滞留时间百分比和总在臂运动距离均明显降低,表明小鼠的探索性和活动性降低,表现出明显的焦虑样行为。在给予慢性束缚应激小鼠 21 d 药物处理后,PEA 2.5 ~ 10 mg/kg 显著逆转了慢性束缚应激所造成的小鼠自主活动和探索性降低现象,说明 PEA 可能对抑郁症的运动迟缓和焦虑症的探索性降低等行为均具有改善作用,存在潜在的抗焦虑和抗抑郁作用。

学习记忆是人类大脑的主要功能,其形成是一个复杂认知过程,主要涉及神经生理机制及生化机制两方面,包括获得、巩固、保持和再现 4 个阶段^[21]。

水迷宫的主要机制是通过动物努力逃避水环境而激发其学习和记忆能力^[17,22],通过训练次数增加,小鼠对固定位置(隐蔽平台)产生记忆力得到巩固,形成稳定的空间位置认知。越来越多的研究表明,长期应激将会损坏动物的空间学习和记忆能力^[23-24]。水迷宫的实验结果显示,与空白对照组相比,模型组小鼠水迷宫寻台潜伏期明显增加,固定时间内的运动距离也增加,表明慢性束缚应激使小鼠学习兴趣降低,学习记忆能力受损,空间认知能力也明显下降,可能与慢性束缚应激引起的小鼠反应迟钝,学习记忆能力下降有关,与文献相符^[24]。PEA 5、10 mg/kg 及氟西汀 10 mg/kg 组小鼠水迷宫寻台潜伏期显著缩短,说明 5 ~ 10 mg/kg PEA 对小鼠学习记忆能力有一定改善作用;PEA 10 mg/kg 及氟西汀 10 mg/kg 组小鼠水中运动距离明显减少,说明 PEA 10 mg/kg 可以改善小鼠空间认知能力。本研究中 PEA 对应激小鼠学习记忆能力的改善是由于其对小鼠焦虑抑郁行为的改善作用抑或由于其它机制的作用,为此课题组也初步探讨了其对海马胆碱系统的影响。

HPA 轴是神经内分泌系统的枢纽,维持着机体内环境稳定。精神神经系统研究发现,抑郁症多伴随 HPA 轴功能亢进^[25]。HPA 轴由下丘脑、垂体和肾上腺 3 个部分构成整个反馈系统,三者相辅相成。HPA 轴是应激反应的中枢,机体在接受长期的应激下,HPA 轴不断激活,通过作用于肾上腺皮质,诱发糖皮质激素过度分泌。HPA 轴持久的机能亢进可以严重影响人体肾上腺的功能和结构^[26]。有报道长期的应激引起促肾上腺皮质激素释放激素、ACTH 和糖皮质激素释放^[27],形态学观察表现为小鼠肾上腺皮质增生,髓质萎缩,故检测过程中可以出现肾上腺指数的显著增加,这与 HPA 轴机能亢进密切相关。

慢性束缚应激 21 d 后,与空白对照组相比,慢性束缚应激模型小鼠血清 ACTH 和 CORT 水平显著增高,肾上腺指数也增加,提示模型组小鼠存在 HPA 轴功能亢进;与应激模型组比较,PEA 2.5 ~ 10 mg/kg 和氟西汀 10 mg/kg 显著降低小鼠血清 ACTH 水平,PEA 5、10 mg/kg 显著降低小鼠血清 CORT 水平和小鼠肾上腺指数。这些结果提示 PEA 可逆转应激诱导的肾上腺增生、ACTH 和 CORT 分泌异常增加,缓解应激引发的小鼠焦虑抑郁样症状,其效应与阳性对照药氟西汀无明显区别。

5-HT 为单胺类神经递质,目前普遍认为其脑内含量异常是抑郁症主要发病机制之一。5-HT 假说认为抑郁症是由于中枢神经系统中 5-HT 释放减少,突

触间隙含量下降所致,并且直接参与调节精神与情绪变化^[28]。越来越多的研究表明,5-HT含量耗竭后,在动物受到应激之后,其抑郁、焦虑等症状表现更加明显,认知和空间记忆能力也显著下降。抗抑郁药物治疗后,伴随中枢内5-HT含量的增加其抑郁症状亦明显改善^[26,29]。这与本实验的结果相符,在慢性束缚应激21 d后,小鼠海马5-HT含量显著下降。在经过阳性对照药氟西汀(5-HT再摄取抑制剂,通过抑制5-HT转运体、增加突触间隙中5-HT含量发挥抗抑郁作用)10 mg/kg及PEA 10 mg/kg处理后其海马5-HT含量明显升高,但PEA 10 mg/kg对海马5-HT的增高程度低于等剂量的氟西汀,且PEA 2.5、5 mg/kg组对小鼠海马5-HT含量无明显影响,说明PEA对中枢5-HT的调节效应弱于5-HT再摄取抑制剂氟西汀。以上结果提示PEA抗焦虑抑郁样作用的机制可能与调节HPA轴功能和5-HT含量有关,且存在一定的量效关系,但对单胺类递质5-HT的作用可能不是其主要机制。

在脑内神经递质中,分布广泛的乙酰胆碱与学习记忆密切相关,其主要功能是维持意识的清醒^[30],乙酰胆碱酯酶参与乙酰胆碱的分解,胆碱酯酶的含量和脑内胆碱能纤维分布复杂性决定了中枢胆碱能系统在影响认知功能方面的重要性^[31-32]。Mineur等^[23]研究证实胆碱能信号还参与焦虑和情绪相关行为。Müller等^[33]通过药动学数据分析表明,临床上常用的抗抑郁药氟西汀为人类血清和红细胞膜的胆碱酯酶抑制剂,Machado等^[29]也证实,嗅球切除抑郁模型小鼠表现出抑郁样行为同时伴随海马乙酰胆碱酯酶活性的增加,而氟西汀慢性应用可以逆转此效应。本研究中对海马乙酰胆碱酯酶的检测结果显示,与空白对照组相比,慢性束缚应激模型小鼠AChE活性显著增加,说明慢性束缚应激可以通过提高AChE活性以增加ACh的水解,从而降低ACh水平而使小鼠学习记忆能力下降。与模型组比较,仅PEA 10 mg/kg及氟西汀 10 mg/kg可以降低小鼠海马AChE活性,PEA 2.5、5 mg/kg对小鼠AChE活性均无明显影响。因为乙酰胆碱的生物学功能与乙酰胆碱酯酶、乙酰胆碱转移酶水平、胆碱能受体亚型的结合能力和突触前后乙酰胆碱受体数目均直接相关,所以单一指标检测无法完全评估药物对中枢乙酰胆碱系统的影响,仅初步推测中枢胆碱系统也可能参与了PEA的抗焦虑抑郁样作用,确切结论尚需要进一步研究。

综上所述,PEA 2.5~10 mg/kg可以改善慢性束缚应激小鼠抑郁及焦虑样行为,且存在一定的量效

关系,其作用机制可能与逆转亢进的HPA轴功能及增高中枢5-HT含量,参与中枢胆碱系统调节有关,但其具体作用机制有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Al-Busaidi IS, Alamri Y. Poststroke anxiety and depression: findings from Saudi Arabia [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(7): 1653-1654.
- [2] Impellizzeri D, Ahmad A, Bruschetta G, et al. The anti-inflammatory effects of palmitoylethanolamide (PEA) on endotoxin-induced uveitis in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 761: 28-35.
- [3] Cordaro M, Impellizzeri D, Bruschetta G, et al. A novel protective formulation of Palmitoylethanolamide in experimental model of contrast agent induced nephropathy [J]. *Toxicol Lett*, 2016, 240(1): 10-21.
- [4] Guan LP, Zhao DH, Xiu JH, et al. Synthesis and anti-convulsant activity of *N*-(2-hydroxyethyl) amide derivatives [J]. *Arch Pharm*, 2009, 342(1): 34-40.
- [5] Eligaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, et al. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells [J]. *Neuron*, 2006, 49(1): 67-79.
- [6] Muccioli GG, Stella N. Microglia produce and hydrolyze palmitoylethanolamide [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 54(1): 16-22.
- [7] Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, et al. Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(21): 7767-7775.
- [8] Déciga-Campos M, Ramírez-Marín PM, López-Muñoz FJ. Synergistic antinociceptive interaction between palmitoylethanolamide and tramadol in the mouse formalin test [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 765(10): 68-74.
- [9] Yu HL, Deng XQ, Li YJ, et al. *N*-palmitoylethanolamide, an endocannabinoid, exhibits antidepressant effects in the forced swim test and the tail suspension test in mice [J]. *Pharmacol Rep*, 2011, 63(3): 834-839.
- [10] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, 85(3): 367-370.
- [11] Yu HL, Sun LP, Li MM, et al. Involvement of norepinephrine and serotonin system in antidepressant-like effects of oleoylethanolamide in the mice models of behavior despair [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 593(4): 24-28.
- [12] 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.

- [13] Haj-Mirzaian A , Kordjazy N , Ostadhadi S , et al. Fluoxetine reverses the behavioral despair induced by neurogenic stress in mice: role of *N*-methyl-D-aspartate and opioid receptors [J]. *Can J Physiol Pharmacol* , 2016 , 94(6) : 599-612.
- [14] Ostadhadi S , Ahangari M , Nikoui V , et al. Pharmacological evidence for the involvement of the NMDA receptor and nitric oxide pathway in the antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test [J]. *Biomed Pharmacother* , 2016 , 82: 713-721.
- [15] 蒋 曦 , 田福荣 , 赵应征. 小鼠慢性酒精中毒及戒断过程中抑郁样行为的改变及其共病机制 [J]. *中国病理生理杂志* , 2016 , 32(2) : 296-301.
- [16] 沈忠飞 , 王志坚 , 潘巍巍 , 等. 氟西汀调控 CUMS 抑郁大鼠海马突触重塑 [J]. *中国病理生理杂志* , 2016 , 32(9) : 1642-1647.
- [17] 周科成 , 佳娜提 , 吴黄辉 , 等. 急、慢性束缚应激对小鼠情绪和学习记忆能力的不同影响 [J]. *神经解剖学杂志* , 2013 , 29(2) : 145-148.
- [18] Jindal A , Mahesh R , Bhatt S. Etazolate rescues behavioral deficits in chronic unpredictable mild stress model: modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and brain-derived neurotrophic factor level [J]. *Neurochem Int* , 2013 , 63(5) : 465-475.
- [19] Oler JA , Fox AS , Shelton SE , et al. Amygdalar and hippocampal substrates of anxious temperament differ in their heritability [J]. *Nature* , 2010 , 466(7308) : 864-868.
- [20] Yeung M , Treit D , Dickson CT , et al. Ventral hippocampal histamine increases the frequency of evoked theta rhythm but produces anxiolytic-like effects in the elevated plus maze [J]. *Neuropharmacology* , 2016 , 106: 146-155.
- [21] Moreira PI , Santos MS , Oliverira CR , et al. Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets* , 2008 , 7(1) : 3-10.
- [22] Morris RG , Garrud P , Rawlins JN , et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions [J]. *Nature* , 1982 , 297(5868) : 681-683.
- [23] Mineur YS , Obayemi A , Wigstrand MB , et al. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2013 , 110(9) : 3573-3578.
- [24] Garner B , Wood SJ , Pantelis C , et al. Early maternal deprivation reduces prepulse inhibition and impairs spatial learning ability in adulthood: no further effect of post-pubertal chronic corticosterone treatment [J]. *Behav Brain Res* , 2007 , 176(2) : 323-332.
- [25] 陈 瑶 , 韩 婷 , 芮耀诚 , 等. 积雪草总苷对实验性抑郁症大鼠血清皮质酮和单胺类神经递质的影响 [J]. *中药材* , 2005 , 28(6) : 492-496.
- [26] Jin P , Yu HL , Tian-Lan , et al. Antidepressant-like effects of oleylethanolamide in a mouse model of chronic unpredictable mild stress [J]. *Pharmacol Biochem Behav* , 2015 , 133: 146-154.
- [27] Kim JJ , Diamond DM. The stressed hippocampus , synaptic plasticity and lost memories [J]. *Nat Rev* , 2005 , 3(6) : 453-462
- [28] Lu SH , Guo J , Cai C , et al. Effects of Kaixin Powder on expression of 5-HT receptor in hippocampus of depressed rats induced by CUMS [J]. *Chin Herb Med* , 2015 , 7(2) : 150-154.
- [29] Machado DG , Cunha MP , Neis VB , et al. Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy [J]. *Pharmacol Biochem Behav* , 2012 , 103(2) : 220-229.
- [30] Gold PE. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory [J]. *Neurobiol Learn Mem* , 2003 , 80(7) : 194-210.
- [31] Perry E , Walker M , Grace J , et al. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness [J]. *Trends Neurosci* , 1999 , 22(6) : 273-280.
- [32] Palmer D , Creighton S , Prado VF , et al. Mice deficient for striatal vesicular acetylcholine transporter (VACHT) display impaired short-term but normal long-term object recognition memory [J]. *Behav Brain Res* , 2016 , 311: 267-278.
- [33] Müller TC , Rocha JB , Morsch VM , et al. Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity [J]. *Biochim Biophys Acta* , 2002 , 1587(1) : 92-98.

(责任编辑: 林白霜 , 罗 森)