

## 咖啡酸对慢性应激大鼠的抗抑郁作用

马庆阳, 杨俊卿, 罗文, 罗映, 余华荣

(重庆医科大学药学院药理学教研室, 重庆 410016)

**摘要:**目的 探讨咖啡酸对慢性应激大鼠的抗抑郁作用。方法 采用各种慢性不可预见轻微刺激建立大鼠抑郁模型。21 d 后, ig 给予大鼠咖啡酸 10, 30 和 50 mg·kg<sup>-1</sup>, 连续 21 d。通过旷场实验检测中央格停留时间、水平活动和垂直活动情况, 通过强迫游泳实验检测大鼠静止不动行为百分比(PI); 检测海马超氧化物歧化酶(SOD)活性与丙二醛(MDA)含量。结果 与正常对照组相比, 模型组大鼠在旷场实验中央格停留时间增长, 水平活动和垂直活动减少, 强迫游泳静止不动状态增加, SOD 活性显著降低, MDA 含量显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 咖啡酸 10~50 mg·kg<sup>-1</sup> 组能够显著缩短停留时间( $P < 0.05$ )、增加垂直活动( $P < 0.01$ ), 但对水平活动无明显影响。模型组 PI 为(79.69 ± 15.84)%, 咖啡酸 10~50 mg·kg<sup>-1</sup> 组 PI 显著降低, 分别为(16.00 ± 2.11)%, (10.33 ± 2.92)% 和(7.33 ± 2.63)%。与正常对照组相比, 模型组 SOD 酶活性显著降低, MDA 含量显著增加( $P < 0.01$ ), 与模型组相比, 咖啡酸 10~50 mg·kg<sup>-1</sup> 能够显著增加 SOD 酶活性, 分别为模型组的 1.50, 2.46 和 2.59 倍( $r = 0.915, P < 0.01$ ); MDA 含量显著降低, 分别为模型组的 18.64%, 11.37% 和 6.35% ( $P < 0.01$ ), 且呈剂量依赖性( $r = 0.982, P < 0.01$ )。咖啡酸与舍曲林 5 mg·kg<sup>-1</sup> 的作用相似。结论 咖啡酸对慢性应激大鼠有一定的抗抑郁作用。

**关键词:** 咖啡酸; 慢性轻度不可预见应激; 旷场实验; 强迫游泳; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

**中图分类号:** R964 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)02-0173-04

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.02.009

目前治疗抑郁症的针对性药物主要以 5-羟色胺(serotonin, 5-HT)再摄取抑制剂和去甲肾上腺素(noradrenalin, NA)再摄取抑制剂为主。近年来中枢神经系统氧化应激和炎症反应与抑郁发生发展的关系备受关注。5-脂氧酶(5-lipoxygenase, 5-LO)是催化花生四烯酸生成白三烯类(leukotrienes, LTs)的关键酶, LTs 参与了神经中枢与外周炎症反应过程, 在氧化应激过程中举足轻重。5-LO 抑制剂咖啡酸通过抑制 5-LO 的激活, 抑制 LTs 的生成, 减轻氧化应激损伤, 对大鼠海马等组织损伤有明显保护作用<sup>[1]</sup>。前期研究发现咖啡酸对神经元退行性病变有良好的保护作用<sup>[2]</sup>。Takeda 等<sup>[3-4]</sup>通过分析咖啡酸对强迫游泳致急性抑郁模型和冰水刺激致急性抑郁模型的行为学作用, 预测咖啡酸可能有一定的抗抑郁作用。急性抑郁模型仅是模拟短时的抑郁状态, Takeda 等也仅是提出咖啡酸抗抑郁作用可能与其抗氧化应激作用有关的初步设想。本实验通过模

拟各种慢性不可预见性轻度刺激, 建立大鼠抑郁状态模型, 观察 5-LO 抑制剂咖啡酸对大鼠抑郁状态的作用, 并从氧化应激初步分析其作用机制。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 药品与试剂

咖啡酸(南京泽朗医药科技有限公司), 批号: ZL1006010; 盐酸舍曲林(四川省百草生物药业有限公司), 批号: 090202; 测总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒, 批号: 20110221; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒, 批号: 20110223; 双缩脲法总蛋白测试盒, 批号: 20101110(均南京建成生物技术有限公司); 其余试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 主要仪器

自制旷场行为测试仪(100 cm × 100 cm × 50 cm 木箱, 内壁与底面漆成黑色, 底面分为 5 × 5 个正方小格); 自制强迫游泳行为测试仪[高 50 cm, 直径 30 cm, 其内水深 30 cm, 水温 24 ~ 26℃]; 恒温水浴锅; UV-3150 紫外可见分光光度计(日本岛津公司)。

#### 1.3 动物、慢性轻度不可预见应激大鼠抑郁模型建立及分组

清洁级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 180 ~ 220 g,

**作者简介:** 马庆阳(1988 -), 女, 硕士研究生, 主要从事神经精神药理学研究; 杨俊卿(1969 -), 男, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事神经精神药理学研究。

**通讯作者:** 杨俊卿, E-mail: cqjyang2004@yahoo.com.cn, Tel: 13637809247

由重庆医科大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(渝)2007-0001。在实验条件下饲养 7 d 以适应实验环境,在此期间进行抚摸以适应实验员的操作。造模前自由饮食饮水,室温 22 ~ 24℃,湿度 40% ~ 70%,光暗周期 12 h:12 h。

60 只 SD 大鼠随机分为 6 组,每组 10 只,参考慢性不可预知的温和型应激模型和孤养模型并加以改进<sup>[5]</sup>(后均称慢性应激)。正常对照组大鼠采用大笼饲养,每笼 5 只,正常进食饮水,不给予任何刺激。其他 5 组大鼠每笼 1 只孤养,并接受 21 d 应激刺激,刺激包括:冰水游泳(4 ~ 5℃,5 min)、热水游泳(40℃,5 min)、禁水(24 h)、禁食(24 h)、禁水食(24 h)、潮湿垫料(将水加入干净木屑,充分混合直至潮湿后替换鼠笼内干燥垫料)、束缚(自制束缚桶,塑料做成,长 20 cm,直径 10 cm,头为直径 4 cm 的出气孔,中干及尾部直径 8 cm,尾部可开合,4 h)、昼夜颠倒(24 h)、异物刺激(经消毒后 3 cm × 3 cm 布条或石块)和噪声刺激(1500 Hz,92 dB,1 h),实验在重庆医科大学动物实验中心功能实验室进行。每日随机给予一种刺激,3 d 内不重复。21 d 后,按照分组,分别 ig 给予生理盐水、舍曲林 5 mg·kg<sup>-1</sup> 和咖啡酸 10, 30 和 50 mg·kg<sup>-1</sup>, 连续 21 d。

#### 1.4 旷场行为观察

参照许晶等<sup>[6]</sup>所使用的旷场实验方法,给药 21 d 后进行旷场(open-field test)行为观察。在可见度 5 m 的黑暗情况下,将大鼠放在正中央格,观察 5 min 内活动情况。以动物穿越底面方块数为水平活动(crossing)得分,以直立次数为垂直活动(rearing)得分,以初次在中央格停留时间为潜伏期(latent time)。每只大鼠实验结束后对旷场行为测试仪进行彻底清洁。

#### 1.5 强迫游泳观察

给药 21 d 后,参照 Cryan 等<sup>[7]</sup>所改良的强迫游

泳实验方法并作改进后进行强迫游泳(forced swimming)行为观察。将大鼠放入水池,记录 300 s 内每 10 s 末大鼠行为(包括攀爬行为、游泳行为和静止不动行为)。攀爬行为指大鼠在泳池中沿着泳池内壁使用前爪向上攀爬的行为;游泳行为指大鼠在泳池内水平面上以及泳池内四周游动;静止不动行为指大鼠除了为避免没入水中而向上的主动运动外,无其他行为。实验结果以静止不动行为所占百分比(percentage of immobility, PI)表示。

#### 1.6 海马 SOD 活性和 MDA 含量的测定

行为学观察结束后,每组各取 4 只大鼠,断头后分离全脑,并在冰面上快速分离出海马,用冰生理盐水制成 10 g·L<sup>-1</sup> 匀浆。以黄嘌呤酶法测定 SOD 活性,以硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量。蛋白质含量采用双缩脲法。具体操作按照 SOD 和 MDA 试剂盒说明书要求进行。

#### 1.7 统计学分析

实验结果数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS16.0 统计软件进行分析,用单因素 ANOVA 分析后再进行 *t* 检验进行组间比较。

## 2 结果

### 2.1 咖啡酸对慢性应激大鼠的旷场行为的影响

表 1 结果显示,旷场行为测试发现,与正常对照组相比,慢性应激模型组中央格停留时间显著增加( $P < 0.01$ ),水平活动次数和垂直活动次数显著降低( $P < 0.01$ )。与慢性应激模型组相比,舍曲林 5 mg·kg<sup>-1</sup> 组的中央格停留时间显著缩短( $P < 0.01$ ),水平活动次数显著增多( $P < 0.01$ ),而垂直活动情况无显著差异。咖啡酸 0 ~ 50 mg·kg<sup>-1</sup> 组大鼠组中央格停留时间均显著缩短( $P < 0.01$ ),水平活动次数显著增加( $P < 0.01$ ),垂直活动无显著差异。

Tab.1 Effect of caffeic acid on latent time, rearing and crossing in open-field test in chronic mild unpredictable stress rats

Group	Latent time/s	Rearing	Crossing
Normal control	1.2 ± 0.7	5.7 ± 2.4	34 ± 14
Model	2.6 ± 1.8**	1.4 ± 1.4**	6 ± 4**
Model + sertraline 5	1.2 ± 0.4##	3.6 ± 1.5	26 ± 16##
Model + caffeic acid 10	1.6 ± 1.1#	4.7 ± 4.1	31 ± 12##
30	1.4 ± 0.7##	2.8 ± 1.6	31 ± 10##
50	1.3 ± 0.4##	1.9 ± 2.0	33 ± 8##

Depressive model in rats was established by chronic mild unpredictable stress depression in 21 d. After that, caffeic acid 5 - 50 mg·kg<sup>-1</sup> were ip given for 21 d.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with model group.

## 2.2 咖啡酸对慢性应激大鼠强迫游泳行为的影响

强迫游泳实验表明,与正常对照组相比,慢性应激模型组大鼠静止不动行为显著增加 ( $P < 0.01$ )。与慢性应激模型组相比,舍曲林  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组的静止时间显著缩短 ( $P < 0.01$ )。咖啡酸  $10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  能显著缩短抑郁大鼠静止不动时间,且呈剂量依赖性 ( $r = 0.985, P < 0.01$ ) (表 2)。

**Tab. 2 Effect of caffeic acid on percentage of immobility (PI) in depressive rats**

Group	PI/%
Normal control	$5.9 \pm 3.2$
Model	$79.7 \pm 15.8^{**}$
Model + sertraline 5	$18.4 \pm 4.8^{##}$
Model + caffeic acid 10	$16.0 \pm 2.1^{##}$
30	$10.3 \pm 2.9^{##}$
50	$7.3 \pm 2.6^{##}$

See Tab 1 for the legend. PI (%) = immobility rate/total rate  $\times 100\%$ .  $\bar{x} \pm s, n = 10$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal control group; ##  $P < 0.01$ , compared with model group.

## 2.3 咖啡酸对慢性应激大鼠海马组织 SOD 活性及 MDA 含量的影响

表 3 结果显示,与正常对照组比较,慢性应激模型组大鼠海马 SOD 活性显著降低,MDA 含量显著升高 ( $P < 0.01$ )。与慢性应激模型组相比,舍曲林能够显著升高大鼠海马 SOD 活性,降低 MDA 含量 ( $P < 0.01$ );咖啡酸  $10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  也能剂量依赖性地显著提高 SOD 活性 ( $r = 0.926, P < 0.01$ ),和降低 MDA 含量 ( $r = 0.982, P < 0.01$ )。

**Tab. 3 Effect of caffeic acid on superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in depressive rats**

Group	SOD/ $\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$ protein	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ protein
Normal control	$17.80 \pm 0.13$	$0.106 \pm 0.238$
Model	$6.48 \pm 0.39^{**}$	$1.513 \pm 0.395^{**}$
Model + sertraline 5	$9.90 \pm 0.46^{##}$	$0.420 \pm 0.010^{##}$
Model + caffeic acid 10	$9.69 \pm 0.20^{##}$	$0.282 \pm 0.003^{##}$
30	$15.90 \pm 0.44^{##}$	$0.172 \pm 0.025^{##}$
50	$16.79 \pm 0.06^{##}$	$0.096 \pm 0.001^{##}$

See Tab 1 for the legend.  $\bar{x} \pm s, n = 4$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal control group; ##  $P < 0.01$ , compared with model group.

## 3 讨论

慢性应激可以引起人类及动物的下丘脑-垂体-

肾上腺皮质轴功能亢进,进而出现抑郁状态<sup>[7]</sup>,本实验所建立模型是目前国内外学者研究抑郁发病机制和抗抑郁药物的主要模型之一。旷场行为测试可模拟抑郁患者行动力下降、中枢神经系统抑制的状况。本研究使用改良后的强迫游泳实验,采用盲法检测大鼠 5 min 内每 10 s 末 3 种行为出现的频率,通过本实验室前期研究对比发现,此方法与 Cryan 等<sup>[7]</sup>提出的每 5 s 末检测一次的方法结果无显著差异,有一定可靠性和可行性;本实验中大鼠处于不动状态时间增长,在一定程度上模拟了抑郁患者“行为绝望”的状态,近似于情绪低落所表现的情况<sup>[8]</sup>。

本实验所采用的咖啡酸给药剂量参照公认大鼠 5-LO 抑制剂的使用剂量 ( $10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )<sup>[9-10]</sup>。ig 给予咖啡酸后,慢性应激大鼠在旷场中央格的停留时间显著缩短,水平活动情况显著增加,并在强迫游泳实验中静止不动状态减少,且呈剂量依赖性,表明咖啡酸对大鼠抑郁行为有明显的改善作用,与 Takeda 等<sup>[3-4]</sup>采用强迫游泳和电刺激造成急性抑郁症治疗作用相似。研究证实抑郁患者记忆能力会伴随治疗得到恢复<sup>[11]</sup>。本研究显示,ig 给予咖啡酸后,海马氧化应激情况改善,说明咖啡酸的抗抑郁作用与氧化应激有关。咖啡酸通过抑制 5-LO 激活,使海马花生四烯酸代谢减慢,LTs 释放减少,而 LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> 和 LTE<sub>4</sub> 可与体内一些重要受体结合,诱导海马氧化应激反应的发生;因此,5-LO 激活被抑制必然导致海马氧化应激反应减弱,使得体内调控氧化反应的主要活性酶之一——SOD 活性升高,从而使海马损伤减轻,表现为 MDA 含量明显降低<sup>[12]</sup>。由此可见,咖啡酸具有修复抑郁状态所致海马损伤的作用。但是,抑郁状态与脑内许多区域有关,咖啡酸除了对抑郁海马的损伤修复外,对于其他部位的损伤是否具有修复作用需要进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] Zhang P, Yang JQ, Su Q. Effects of caffeic acid on brain damage induced by chronic aluminum overload in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2009, **25**(2):197-200.
- [2] Chen HL, Shang CF. Progress of studies for scavenging free radical on antiaging traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中医药杂志), 2007, **5**(8):14-17.
- [3] Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, **449**(3):261-267.

- [4] Takeda H, Tsuji M, Yamada T, Masuya J, Matsushita K, Tahara M, *et al.* Caffeic acid attenuates the decrease in cortical BDNF mRNA expression induced by exposure to forced swimming stress in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, **534**(1-3):115-121.
- [5] Wang Z, Hu SY, Song WX, Zhang CH, Chen CH. Effect of Baisong tablet on behavior and CORT, ACTH in plasma of chronic stress depression rats [J]. *Chin J Clin Psychol*(中国临床心理学杂志), 2004, **12**(2):185-187,170.
- [6] Xu J, Li XQ. The establishment and evaluation of chronic unpredictable mild stress depression model [J]. *Chin J Behav Med Sci*(中国行为医学科学), 2003, **12**(1):14-17.
- [7] Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, **23**(5):238-245.
- [8] Lin WJ, Wang DL, Pan YQ. Depression research of psychoneuroimmunology: the role of cytokines [J]. *Adv Psychol Sci*(心理科学进展) 2008, **16**(3):404-410.
- [9] Zhou Y, Fang SH, Ye YL, Chu LS, Zhang WP, Wang ML, *et al.* Caffeic acid ameliorates early and delayed brain injuries after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, **27**(9):1103-1110.
- [10] Shi B, Yang JQ, Luo WN. Protective effects of caffeic acid on global cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *J China Pharm*(中国药房), 2011, **22**(9):795-798.
- [11] Zhou RY, Liu XH. A comparison between major depression and dysthymia on neuropsychological tests [J]. *Sichuan Ment Health*(四川精神卫生), 2002, **15**(1):4-7.
- [12] Huang Y, Yang JQ, Xie LY. Protective effect of caffeic acid on damage induced by aluminum-overload in primary cultured rat hippocampal neuron [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2009, **25**(2):1605-1609.

## Effect of caffeic acid on depressive rats induced by chronic mild unpredictable stress

MA Qing-yang, YANG Jun-qing, LUO Wen, LUO Ying, YU Hua-rong

(Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 410016, China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To observe effect of caffeic acid on depressive behavior in rats induced by chronic mild unpredictable stress. **METHODS** Depressive model in rats was established by chronic mild unpredictable stress depression for 21 d. After that, caffeic acid 10, 30 and 50 mg·kg<sup>-1</sup> were ig given in rats, for 21 d. Open-field test was used to evaluate the latent time, and the condition of rearing and crossing. Percentage of immobility (PI) was confirmed by forced swimming test in rats. Superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in hippocampus were determined to preliminary the antiexpressive mechanism of caffeic acid. **RESULTS** Compared with normal control group, latent time obviously increased, crossing time and rearing time in rats significantly decreased in model group, and the duration of immobility in rats significantly increased. Compared with model group, caffeic acid 10 – 50 mg·kg<sup>-1</sup> obviously declined the latent time ( $P < 0.05$ ), and lifted the crossing time ( $P < 0.01$ ), however it could not change rearing time. PI significantly decreased in caffeic acid 10, 30 and 50 mg·kg<sup>-1</sup> groups, they were (16.0 ± 2.1)%, (10.3 ± 2.9)% and (7.3 ± 2.6)%, respectively. Compared with normal control group, SOD activity increased and MDA content significantly decreased in model group ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, caffeic acid obviously increased SOD (1.50, 2.46 and 2.59 times to model group ( $r = 0.915$ ,  $P < 0.01$ ) and decreased MDA (18.64%, 11.37% and 6.35% of model group,  $P < 0.01$ ) in dose-dependent manner ( $r = 0.982$ ,  $P < 0.01$ ). Effect of caffeic acid was similar to sertraline 5 mg·kg<sup>-1</sup>. **CONCLUSION** Caffeic acid should have an effect on depressive rats induced by chronic mild unpredictable stress.

**Key words:** caffeic acid; chronic stress; open-field test; forced swimming test; superoxide dismutase; malondialdehyde

Corresponding author: YANG Jun-qing, E-mail: cqjqyang2004@yahoo.com.cn, Tel: 13637809247

(收稿日期: 2011-09-02 接受日期: 2012-02-15)

(本文编辑: 乔虹)