

小檗碱改善5XFAD小鼠抑郁和焦虑

余伟^{1,2},丁立²,陈玉倩²,吴向锋²,陈俊²

摘要 目的:明确小檗碱对5XFAD阿尔茨海默病(AD)转基因小鼠的抑郁和焦虑有无改善作用。**方法:**将48只3月龄的5XFAD AD转基因小鼠随机分为对照组、小檗碱低剂量组(50 mg/kg)、小檗碱中剂量组(100 mg/kg)和小檗碱高剂量组(150 mg/kg),每组12只,连续灌胃90 d,利用旷场实验、高架十字迷宫实验、悬尾实验和强迫游泳实验检测5XFAD小鼠行为学指标的变化。**结果:**与对照组比较,小檗碱低剂量组的强迫游泳不动时间和悬尾不动时间减少,高架十字迷宫开放臂停留时间和运动总路程增加($P<0.05$);小檗碱中剂量组的强迫游泳不动时间和悬尾不动时间减少,高架十字迷宫开放臂停留时间、开放臂进入次数、运动总路程增加,旷场中央区时间和中央区路程增加($P<0.01$);小檗碱高剂量组的强迫游泳不动时间和悬尾不动时间减少,高架十字迷宫开放臂停留时间和开放臂进入次数增加,旷场中央区时间增加($P<0.05$)。其中,中剂量小檗碱的效果最明显。**结论:**小檗碱能改善5XFAD小鼠的抑郁和焦虑。

关键词 阿尔茨海默病;小檗碱;5XFAD小鼠;抑郁;焦虑

中图分类号 R741;R749.053 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgnj.20201283

本文引用格式:余伟,丁立,陈玉倩,吴向锋,陈俊.小檗碱改善5XFAD小鼠抑郁和焦虑[J].神经损伤与功能重建,2021,16(9):497-501.

Effect of Berberine on Depression and Anxiety in 5XFAD Mice YU Wei^{1,2}, DING Li², CHEN Yu-qian², WU Xiang-feng², CHEN Jun². 1. Postgraduate Training Basement of Jinzhou Medical University, Taihe Hospital, Hubei 442000, China; 2. Department of Neurology, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Hubei 442000, China

Abstract Objective: To determine whether berberine could improve depression and anxiety in 5XFAD Alzheimer's disease (AD) model mice. **Methods:** A total of 48 3-month-old 5XFAD transgenic AD model mice were randomly allocated into 4 groups with 12 mice in each: control group, low-dose berberine group (50 mg/kg), medium-dose berberine group (100 mg/kg), and high-dose berberine group (150 mg/kg). Mice were given intragastric administrations of berberine every day for 90 days. The changes in behavior indicators of the 5XFAD mice were observed by the open field test, elevated plus maze test, tail suspension test, and forced swimming test. **Results:** Compared with the control group, the low-dose berberine group showed decreased forced swimming time, decreased tail suspension time, increased time spent in open arms of the elevated plus maze, and increased total distance traveled in the elevated plus maze ($P<0.05$); the medium-dose berberine group showed decreased forced swimming time, decreased tail suspension time, increased time spent in open arms of the elevated plus maze, increased open arm entries in the elevated plus maze, increased total distance traveled in the elevated plus maze, increased time spent in the central area of the open field, and increased distance traveled in the central area of the open field ($P<0.01$); the high-dose berberine group showed decreased forced swimming time, decreased tail suspension time, increased time spent in open arms of the elevated plus maze, increased open arm entries in the elevated plus maze, and increased time spent in the central area of the open field ($P<0.05$). Moreover, the effect of medium-dose berberine was the most apparent. **Conclusion:** Berberine could improve depression and anxiety in 5XFAD mice.

Key words Alzheimer's disease; berberine; 5XFAD mice; depression; anxiety

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)作为一种神经退行性疾病,可导致患者记忆力和认知功能的逐渐下降,也可产生明显的神经精神障碍症状,其中以抑郁和焦虑较常见^[1,2]。抑郁和焦虑会严重影响AD患者的生活质量^[2]。小檗碱来源于传统中草药黄连,具有抗炎、抗氧化和神经保护等多种药理作用^[3]。越来越多的研究表明,小檗碱可作为治疗AD的潜在药物^[4,5]。本

研究通过小檗碱干预5XFAD转基因小鼠,并利用旷场实验、高架十字迷宫实验、悬尾实验及强迫游泳实验检测小檗碱对小鼠抑郁和焦虑的影响,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 5XFAD转基因小鼠(28~32g)48只,3月龄,购于美国

作者单位

1. 锦州医科大学十堰市太和医院研究生培养基地

湖北 十堰 442000

2. 十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)神经内科

湖北 十堰 442000

基金项目

湖北省卫生健康委员会面上项目(No. ZY2019M047);

十堰市科学技术研究与开发项目(No. 2020K52)

收稿日期

2020-12-19

通讯作者

陈俊

1060884505@qq.

com

Jackson实验室。所有小鼠饲养在恒温(21℃~22℃)和具备空气过滤的SPF级动物房内,每隔12h光暗循环,自由进食标准鼠粮和饮水。实验方案经湖北医药学院实验动物福利伦理审查委员会批准,并根据国家卫生研究院指南进行护理和使用实验动物。48只小鼠随机分为4组:对照组、小檗碱低剂量组、小檗碱中剂量组、小檗碱高剂量组,每组12只,分别给予小檗碱灌胃,小檗碱低剂量组给予小檗碱50 mg/(kg·d),小檗碱中剂量组给予小檗碱100 mg/(kg·d),小檗碱高剂量组给予小檗碱150 mg/(kg·d),对照组用等容量生理盐水灌胃,灌胃容积均为0.1 mL/30 g,每天灌胃1次,共90 d。

1.1.2 主要试剂和设备 小檗碱(购于Sigma公司);生理盐水购自四川科伦药业公司;旷场实验系统、高架十字迷宫实验系统、悬尾实验系统和强迫游泳实验系统由上海欣软信息科技有限公司提供。

1.2 方法

由于小鼠连续进行不同的行为学实验,不同的行为学测试之间可能会相互影响,为了减少行为学实验之间的相互影响可能对实验结果产生的干扰,所有小鼠统一的实验顺序如下:在灌胃满90 d后,行为学测试第1天行旷场实验,第2天行高架十字迷宫实验,第3天行悬尾实验,第4天行强迫游泳实验,行为学测试均在上午08:00~12:00之间进行,见图1。

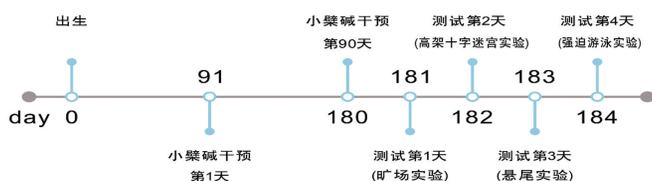


图1 实验时间表

1.2.1 旷场实验 提前30 min将小鼠放入实验房间使小鼠适应环境,减少新环境对小鼠活动的影响。实验装置主要由规格为50×50×50 cm³的敞箱组成。敞箱底部被划分为25个方格,中间9个方格区域被设定为中央区,外周16个方格区域被设定为外周区。测试时将小鼠放入敞箱内自由活动10 min,最后计算小鼠在中央区的停留时间、中央区运动路程和外周区运动路程^[6]。小鼠在中央区的停留时间和运动路程越长表明小鼠焦虑程度越低,反之焦虑程度越高。实验结束后,清除小鼠排泄物,并用乙醇棉对实验箱进行擦拭以消除上一只小鼠的气味。

1.2.2 高架十字迷宫实验 提前30 min将小鼠放入实验房间使小鼠适应环境。实验装置主要由2条开放臂(30×5 cm²)和2条闭合臂(30×5×15 cm³)及中央区(5×5 cm²)组成。测试时首先将小鼠放置于中央区,面向

开放臂,让其在安静环境下自由活动5 min,最后统计小鼠开放臂和闭合臂的停留时间、开放臂和闭合臂的进入次数以及运动总路程^[6]。小鼠在开放臂的停留时间越长、进入次数越多和运动总路程越长表明小鼠焦虑程度越低,反之焦虑程度越高。

1.2.3 悬尾实验 提前30 min将小鼠放入实验房间使小鼠适应环境。测试时将小鼠尾端悬吊于铁架上,同时使其头部距离地面20 cm,实验过程中全程保持安静,最后统计小鼠6 min内的不动时间。小鼠的不动状态定义为:四肢不动并保持10 s即视为不动^[7]。小鼠的不动时间越长表明小鼠的抑郁程度越高,反之抑郁程度越低。

1.2.4 强迫游泳实验 提前30 min将小鼠放入实验房间使小鼠适应环境。实验装置主要由高35 cm、直径15 cm的透明玻璃杯组成。测试时将小鼠缓慢放入水中,强迫小鼠游泳6 min,最后统计小鼠后4 min内的不动时间。实验过程中保持安静,并且保持玻璃杯水深10 cm,水温(25±1)℃。小鼠的不动状态定义为:四肢处于漂浮、失去挣扎或只做轻微的动作^[8]。小鼠的不动时间越长表明小鼠的抑郁程度越高,反之抑郁程度越低。

1.3 统计学处理

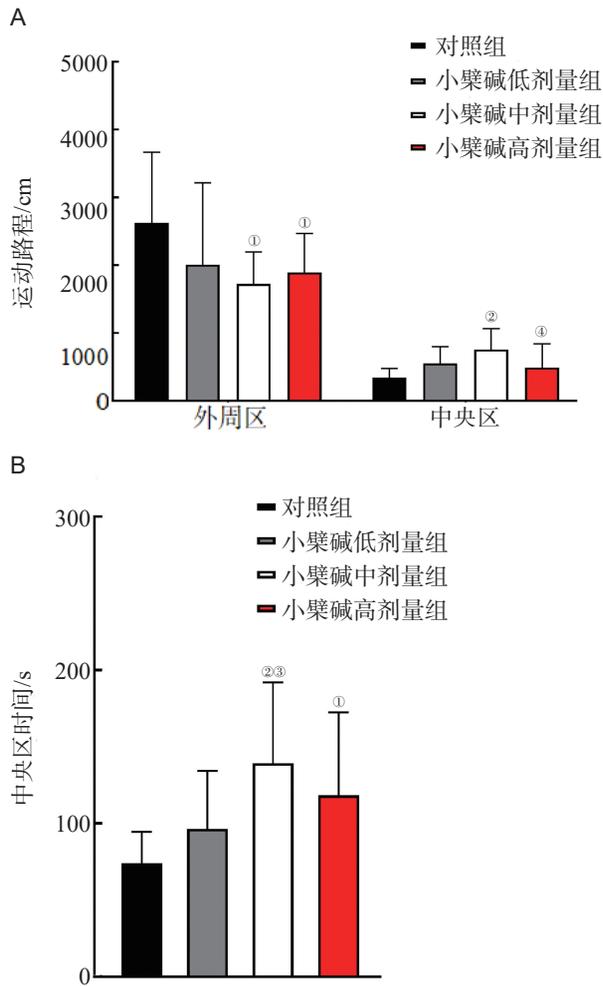
采用SPSS 23.0软件处理数据。符合正态分布及方差齐性的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示;单因素方差分析(ANOVA),LSD-t检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小檗碱对小鼠焦虑的影响

在旷场实验中,与对照组相比,小檗碱中剂量组的中央区运动路程有增加,有显著性差异($P < 0.01$),但低剂量组和高剂量组的中央区运动路程与对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组相比,小檗碱中剂量组和高剂量组的中央区时间增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但低剂量组的中央区时间与对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。与小檗碱低剂量组相比,中剂量组和高剂量组的中央区运动路程差异无统计学意义($P > 0.05$),中剂量组的中央区时间增加($P < 0.05$),高剂量组的中央区时间与低剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$)。与小檗碱中剂量组相比,高剂量组的中央区运动路程减少($P < 0.05$),中央区时间差异无统计学意义($P > 0.05$),见图2。

在高架十字迷宫实验中,与对照组相比,小檗碱干预组的开放臂停留时间均增加(均 $P < 0.01$);小檗碱中剂量组和高剂量组的开放臂进入次数增加($P < 0.01$),低剂量组的进入次数与对照组的差异无统计学意义



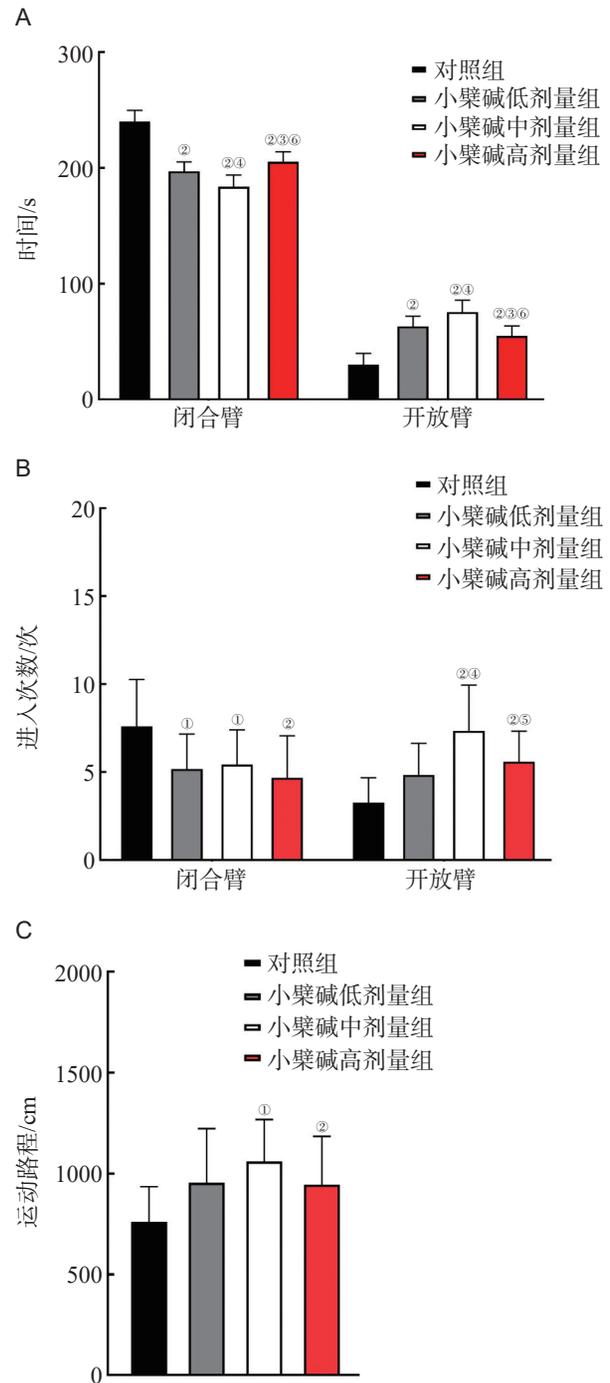
注:A:中央区和外周区的运动路程;B:中央区的停留时间;与对照组比较,^① $P<0.05$,^② $P<0.01$;与小槲碱低剂量组比较,^③ $P<0.05$;与小槲碱中剂量组比较,^④ $P<0.05$

图2 旷场实验结果

($P>0.05$);小槲碱低剂量组和中剂量组的运动总路程增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但高剂量组的运动总路程与对照组的差异无统计学意义($P>0.05$)。与小槲碱低剂量组相比,中剂量组的开放臂停留时间增加($P<0.01$),高剂量组的开放臂停留时间减少($P<0.05$);中剂量组的开放臂进入次数增加($P<0.01$),但高剂量组的进入次数与低剂量组的差异无统计学意义($P>0.05$);高剂量组和中剂量组的运动总路程与低剂量组的差异均无统计学意义($P>0.05$)。与小槲碱中剂量组相比,高剂量组的开放臂停留时间和开放臂进入次数均减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$),运动总路程与中剂量组的差异无统计学意义($P>0.05$),见图3。

2.2 小槲碱对小鼠抑郁的影响

在悬尾实验中,与对照组相比,小槲碱干预组的不动时间均下降($P<0.01$);与小槲碱低剂量组相比,中剂量组和高剂量组的不动时间均下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);小槲碱中剂量组与高剂量组的不动时间差异无

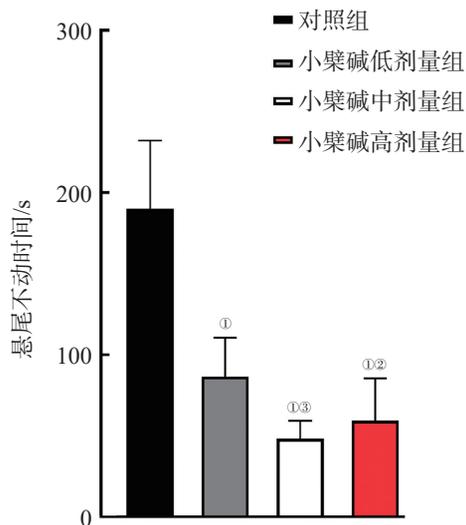


注:A:开放臂和闭合臂的停留时间;B:开放臂和闭合臂的进入次数;C:运动总路程。与对照组比较,^① $P<0.05$,^② $P<0.01$;与小槲碱低剂量组比较,^③ $P<0.05$,^④ $P<0.01$;与小槲碱中剂量组比较,^⑤ $P<0.05$,^⑥ $P<0.01$

图3 高架十字迷宫实验结果

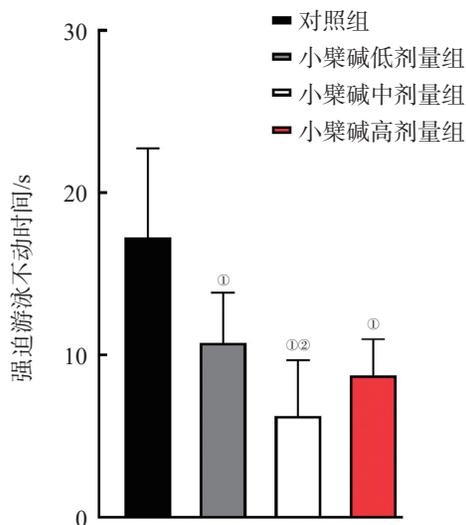
统计学意义($P>0.05$),见图4。

在强迫游泳实验中,与对照组相比,小槲碱干预组的不动时间均下降($P<0.01$);与小槲碱低剂量组相比,中剂量组的不动时间下降($P<0.01$),高剂量组的不动时间与低剂量组的差异无统计学意义($P>0.05$);高剂量组的不动时间与中剂量组的差异无统计学意义($P>0.05$),见图5。



注:与对照组比较,① $P<0.01$;与小檗碱低剂量组比较,② $P<0.05$,③ $P<0.01$

图4 悬尾实验结果



注:与对照组比较,① $P<0.01$;与小檗碱低剂量组比较,② $P<0.01$

图5 强迫游泳实验结果

3 讨论

抑郁和焦虑等神经精神障碍症状是AD患者较常见的精神行为异常,与健康者相比,AD患者更易表现出抑郁和焦虑^[2]。和人类一样,AD模型小鼠在强迫游泳实验和高架十字迷宫实验中也常表现出抑郁和焦虑行为^[9]。最新的研究表明,5XFAD人源化AD转基因小鼠可作为研究AD精神行为症状的动物模型^[10]。在临床实践中,针对AD的抑郁和焦虑多采用西药进行治疗,常用的药物有氟西汀、舍曲林、丁螺环酮等,这些药在用药的起始阶段副作用比较明显,少部分患者不能耐受^[11]。研究报道,中草药黄连主要有效成分小檗碱具有改善抑郁和焦虑等神经精神障碍症状的功效^[12],

而小檗碱耐受性好,价格相对便宜,可成为西药治疗的有益补充。

本研究采用国际上最常用的5XFAD人源化AD转基因小鼠作为AD小鼠模型,结果显示,与对照组相比,在给予不同剂量的小檗碱干预后,小鼠在强迫游泳实验和悬尾实验中的不动时间均减少,这就提示小檗碱可改善5XFAD小鼠的抑郁;在高架十字迷宫实验中,开放臂停留时间、开放臂进入次数、运动总路程均增加(低剂量组的进入次数与对照组相比差异无统计学意义;高剂量组的运动总路程与对照组相比差异无统计学意义),在旷场实验中,运动路程和中央区时间也同样增加(低剂量组和高剂量组的运动路程与对照组相比差异无统计学意义;低剂量组的中央区时间与对照组相比差异无统计学意义),提示小檗碱能改善5XFAD小鼠的焦虑。此外,在三个干预组中,中剂量组的改善效果最好,高剂量其次,这提示小檗碱在治疗5XFAD小鼠时存在一个最适剂量,剂量低了达不到最佳效果,剂量过高疗效非但不增加,反而会增加用药的风险。

小檗碱具有多种生化和药理作用,比如抗炎和抗氧化应激,同时它也能抑制介导AD发病的两种关键酶(β -分泌酶和 γ -分泌酶)的活性^[13,14]。在AD患者的中枢神经系统内可发现较明显的炎症反应,这种神经炎症反应可能是AD较显著的病理特征^[15]。炎症反应中的炎性细胞因子具有神经毒性作用,这种神经毒性作用会导致神经元损伤^[16,17]。而小檗碱可通过降低炎性介质和细胞因子(IL-6、MCP-1、iNOS和COX-2)来抑制炎症反应^[18]。小檗碱的这种抗炎作用可能降低了炎症反应所致的神经毒性,进而延缓AD的进展。同时,在AD患者的中枢神经系统内可检测到氧化应激标志物^[15,19]。氧化应激可诱导 $A\beta$ 沉积和神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)形成^[20,21]。而小檗碱可通过提高AD小鼠大脑中谷胱甘肽过氧化物酶-1/2和谷胱甘肽合成酶的水平以及增强谷胱甘肽还原酶的生物活性和降低 γ -谷氨酰转肽酶的生物活性来发挥抗氧化应激的作用^[22]。此外,神经炎症与氧化应激之间的恶性循环可能导致部分神经功能失调^[23],氧化应激和炎症反应之间的这种恶性循环与NF- κ B信号通路密切相关^[24]。基于NF- κ B信号通路这一重要切入点,有研究发现小檗碱可通过抑制NF- κ B信号通路,发挥抗氧化应激和抗炎的作用,进而降低Tau蛋白异常过度磷酸化,改善AD小鼠的症状^[5,22]。另外, β -分泌酶和 γ -分泌酶依次水解淀粉样蛋白前体蛋白将会导致 $A\beta$ 的生成

和积累。小檗碱可抑制 β -分泌酶和 γ -分泌酶的活性,导致 β -分泌酶和 γ -分泌酶剪切淀粉样蛋白前体蛋白的作用减弱,进而减少A β 沉积,延缓老年斑的形成^[14]。有研究表明,自噬与A β 的清除有关,自噬活性增强有助于清除AD小鼠脑中沉积的A β ,若自噬活性降低将导致A β 沉积的增加。小檗碱可通过增加AD小鼠脑中LC3-II、beclin-1、hVps34和组织蛋白酶D的水平以及降低P62和Bcl-2的水平来增强自噬活性,进而促进AD小鼠海马中A β 的清除,改善AD小鼠的症状^[25]。

本研究证实小檗碱可改善5XFAD小鼠的抑郁和焦虑,可作为AD西药治疗的有益补充,可为AD患者抑郁和焦虑的治疗提供一种新的策略,也为抗AD的中药临床应用提供了重要信息。但本研究也有部分局限性,本研究发现小檗碱50 mg/kg和150 mg/kg对5XFAD小鼠抑郁和焦虑的改善效果并不优于小檗碱100 mg/kg。导致这种结果的原因可能是小檗碱50 mg/kg低于最适宜剂量,而小檗碱150 mg/kg相对于临床有效剂量来说可能过大而致小檗碱改善效果降低。因此,改善5XFAD小鼠抑郁和焦虑最适宜的小檗碱剂量还需进一步探究。此外,有关小檗碱改善5XFAD小鼠抑郁和焦虑的具体作用机制还有待进一步探讨,这也是本研究下一步的研究方向。综上所述,小檗碱能改善5XFAD小鼠的抑郁和焦虑,为进一步探究小檗碱改善5XFAD小鼠抑郁和焦虑的作用机制奠定了基础,同时也为未来小檗碱在AD患者中的应用提供了科学依据。

参考文献

[1] Caraci F, Copani A, Nicoletti F, et al. Depression and Alzheimer's disease: Neurobiological links and common pharmacological targets[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 626: 64-71.

[2] Esmacili MH, Bahari B, Salari AA. ATP-sensitive potassium-channel inhibitor glibenclamide attenuates HPA axis hyperactivity, depression- and anxiety-related symptoms in a rat model of Alzheimer's disease[J]. *Brain Res Bull*, 2018, 137: 265-276.

[3] 梁宇彬, 黄敏, 常鑫, 等. 小檗碱对三转基因阿尔茨海默病小鼠海马组织A β 和Bcl-2、Bax表达的影响[J]. *神经损伤与功能重建*, 2017, 12: 194-196.

[4] de Oliveira JS, Abdalla FH, Dornelles GL, et al. Berberine protects against memory impairment and anxiogenic-like behavior in rats submitted to sporadic Alzheimer's-like dementia: Involvement of acetylcholinesterase and cell death[J]. *Neurotoxicology*, 2016, 57: 241-250.

[5] Cai Z, Wang C, Yang W. Role of berberine in Alzheimer's disease[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2016, 12: 2509-2520.

[6] Yiu AP, Mercaldo V, Yan C, et al. Neurons are recruited to a memory trace based on relative neuronal excitability immediately before training[J]. *Neuron*, 2014, 83: 722-735.

[7] Guida F, Turco F, Iannotta M, et al. Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice[J]. *Brain Behav Immun*,

2018, 67: 230-245.

[8] Walker AK, Budac DP, Bisulco S, et al. NMDA receptor blockade by ketamine abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in C57BL/6J mice[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38: 1609-1616.

[9] Hritcu L, Noumedem JA, Cioanca O, et al. Anxiolytic and antidepressant profile of the methanolic extract of Piper nigrum fruits in beta-amyloid (1-42) rat model of Alzheimer's disease[J]. *Behav Brain Funct*, 2015, 11: 13.

[10] Yang E-J, Mahmood U, Kim H, et al. Alterations in protein phosphorylation in the amygdala of the 5XFamilial Alzheimer's disease animal model[J]. *J Pharmacol Sci*, 2017, 133: 261-267.

[11] Sepehry AA, Lee PE, Hsiung GY, et al. Effect of selective serotonin reuptake inhibitors in Alzheimer's disease with comorbid depression: a meta-analysis of depression and cognitive outcomes[J]. *Drugs Aging*, 2012, 29: 793-806.

[12] Lee B, Sur B, Yeom M, et al. Effect of berberine on depression- and anxiety-like behaviors and activation of the noradrenergic system induced by development of morphine dependence in rats[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2012, 16: 379-386.

[13] Hussien HM, Abd-Elmegied A, Ghareeb DA, et al. Neuroprotective effect of berberine against environmental heavy metals-induced neurotoxicity and Alzheimer's-like disease in rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 111: 432-444.

[14] Cai Z, Wang C, He W, et al. Berberine Alleviates Amyloid-Beta Pathology in the Brain of APP/PS1 Transgenic Mice via Inhibiting beta/gamma-Secretases Activity and Enhancing alpha-Secretases[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2018, 15: 1045-1052.

[15] Huang M, Chen S, Liang Y, et al. The role of berberine in the multi-target treatment of senile dementia[J]. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16: 867-873.

[16] Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism[J]. *Prog Neurobiol*, 2005, 76: 77-98.

[17] Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8: 57-69.

[18] Jia L, Liu J, Song Z, et al. Berberine suppresses amyloid-beta-induced inflammatory response in microglia by inhibiting nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase signalling pathways[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64: 1510-1521.

[19] 符绩军, 张金臣. 阿尔茨海默病患者认知功能变化与氧化应激指标、总雌二醇及生物可利用雌二醇变化的关系[J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14: 535-537.

[20] Petersen RB, Nunomura A, Lee H-g, et al. Signal transduction cascades associated with oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2007, 11: 143-152.

[21] Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. *Neurosci Bull*, 2014, 30: 271-281.

[22] He W, Wang C, Chen Y, et al. Berberine attenuates cognitive impairment and ameliorates tau hyperphosphorylation by limiting the self-perpetuating pathogenic cycle between NF-kappaB signaling, oxidative stress and neuroinflammation[J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69: 1341-1348.

[23] Prema A, Justin Thenmozhi A, Manivasagam T, et al. Fenugreek Seed Powder Attenuated Aluminum Chloride-Induced Tau Pathology, Oxidative Stress, and Inflammation in a Rat Model of Alzheimer's Disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 60: 209-220.

[24] Seo EJ, Fischer N, Efferth T. Phytochemicals as inhibitors of NF- κ B for treatment of Alzheimer's disease[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 129: 262-273.

[25] Huang M, Jiang X, Liang Y, et al. Berberine improves cognitive impairment by promoting autophagic clearance and inhibiting production of beta-amyloid in APP/tau/PS1 mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Exp Gerontol*, 2017, 91: 25-33.

(本文编辑:王晶)