

白兰氏鸡精减轻抑郁病症作用的研究

张婉菁¹ 陆平¹ 倪银华¹ 吴涛¹ 王雪莹² 傅正伟^{1*}

(¹浙江工业大学生物工程学院, 杭州 310032; ²食益补太平洋有限公司, 新加坡 048423)

摘要 抑郁症是一类以情绪低落、兴趣丧失为核心症状的疾病。目前, 临床研究发现, 抑郁症往往伴随着昼夜节律的紊乱, 但对此类临床表现的产生机制缺乏系统深入的研究。该文建立了慢性温和不可预见性应激(chronic mild unpredictable stimulation, CUMS)抑郁症大鼠模型。在诱导抑郁症模型大鼠过程中通过外源补充白兰氏鸡精(Brand's essence of chicken, BEC), 应用ELISA、荧光定量PCR等方法从生理水平、基因转录水平研究BEC对生物钟系统的影响以及是否具有减轻抑郁症状的作用。研究结果表明, BEC能有效调控和稳定生物钟母钟[下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)]及子钟(肝脏、脂肪组织)中生物钟基因的表达时相, 减缓由CUMS引起的探索行为活动下降以及血清中相关激素的分泌紊乱, 从而减轻抑郁相关症状及有效预防抑郁症的发生。

关键词 抑郁症; 慢性温和不可预见性应激; 白兰氏鸡精; 昼夜节律

The Effect of Brand's Essence of Chicken on Alleviating the Depression

Zhang Wanjing¹, Lu Ping¹, Ni Yinhu¹, Wu Tao¹, Wang Xueying², Fu Zhengwei^{1*}

(¹College of Biotechnology and Biological Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

²Cerebos Pacific Limited, Singapore 048423, Singapore)

Abstract Depression is a kind of disease with the core symptoms of low mood and lack of interest. Recent clinical studies have shown that circadian rhythm disorder was accompanied in the depression group in most cases, while the mechanism of circadian clock in the regulation of depression has not been systematically studied. In the present study, we used SD rats to establish the depression model via a method of chronic mild unpredictable stimulation (CUMS). Moreover, the chicken active ingredient Brand's essence of chicken (BEC) was supplemented to analyze its impact on the biological clock system and further explored the potential effect on alleviating the occurrence of depression by ELISA and Real-time PCR. The results showed that BEC could effectively regulate and stabilize the expression phase of clock genes in both suprachiasmatic nucleus (SCN) and peripheral clock including liver and adipose tissue. In addition, BEC treatment alleviated the decrease of exploratory activity and abnormal hormones secretion in serum caused by depression, which further contributed to the prevention and amelioration of depression.

Keywords depression; chronic mild unpredictable stress; Brand's essence of chicken; circadian rhythm

抑郁症属于情感性精神障碍, 其临床表现为情绪低落、思维迟缓和认知功能受损, 还可能出现睡

眠障碍, 严重患者有反复自杀的倾向等^[1]。最近有报告显示, 中国当前重度抑郁病患者达到1.6%, 其中

收稿日期: 2017-03-17 接受日期: 2017-05-15

浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)(批准号: 2016R403017)和长江学者和创新团队发展计划(批准号: IRT13096)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0571-88320599, E-mail: azwfu@zjut.edu.cn

Received: March 17, 2017 Accepted: May 15, 2017

This work was supported by the Scientific Innovation Program for University Students in Zhejiang Province (Grant No.2016R403017) and Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (Grant No.IRT13096)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88320599, E-mail: azwfu@zjut.edu.cn

网络出版时间: 2017-07-24 10:34:06

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170724.1034.002.html>

农村地区患病率为2.0%, 城市地区为1.7%^[2]。据统计, 抑郁症已成为世界第四大疾患, 到2020年可能成为仅次于心脏病的第二大疾病^[3]。抑郁症的发病原因复杂多样, 但基因遗传和环境因素的相互作用被大部分学者认为是导致抑郁症发病的主要原因。近期, 越来越多的研究表明, 抑郁症的发病机制与生物节律紊乱有密切关系^[4-6]。

生物节律是机体维持内部各种生理活动稳态的定时机制, 如睡眠/觉醒、体温波动、激素的合成和分泌等。有报道称, 生物节律的破坏, 如睡眠剥夺或延迟, 都会对认知能力、情绪和行为产生重要影响^[7]。研究发现, 抑郁症患者常伴随着睡眠障碍^[8], 表明生物钟的紊乱可能会导致抑郁症的发生。此外, 抑郁症患者有非常明显的节律性病状, 主要表现为抑郁心境晨重夜轻^[9]。因此, 合理地利用生物节律的变化可能有利于缓解抑郁症的相关病状。最近有研究表明, 强光结合抗抑郁症药物, 与单纯抗抑郁药物相比, 可以更为有效地治疗抑郁症^[10]。

白兰氏鸡精(Brand's essence of chicken, BEC)作为一种富含蛋白质、氨基酸和二肽的鸡肉提取物, 具有强身健体的功效, 在市场上广受欢迎, 也引起了各国研究学者的关注^[11-13]。我们前期研究发现, BEC能够有效加快颠倒光周期大鼠体内外周生物钟与母钟之间的耦合, 维持生物钟系统的稳态^[14-16]。基于以上研究, 本研究将通过构建慢性温和不可预知性刺激(chronic mild unpredictable stimulation, CUMS)抑郁模型^[17], 从生理水平、血清激素指标和基因转录水平, 全面研究BEC对调控抑郁大鼠生物钟时相及改善抑郁症病症的作用效果, 探索BEC作为预防和缓解抑郁症发生的功能性食品的潜在可能性。

1 材料与方法

1.1 实验动物和方法

雄性8周龄Sprague-Dawley(SD)大鼠由上海莱斯克实验动物有限公司提供。实验动物饲养在严格的人工模拟昼夜循环的环境中, 温度控制在 22 ± 1 °C, 光照周期为12 h明/12 h暗(12L/12D), 光源为日光灯, 光照强度约为200 lux, 自由饮水和进食。在LD光周期下, 将自然时间转换为授时时间(Zeitgeber time, ZT), 光照起点定义为ZT0, 黑暗起点定义为ZT12, 其余时间按照对应的ZT时间点进行转换。BEC由食益补太平洋有限公司提供, 70 mL/瓶, 经冻成干粉后, 外

观为淡黄色粉末, 约为6 g/瓶。BEC富含氨基酸、蛋白质以及具有生物活性的多肽, 其中具有重要生理功能的多肽主要包括肌肽(1 167 mg/100 g)、鹅肌肽(3 500 mg/100 g)和ProBaptigen(0.5 mg/100 g)。实验时, 按体重称取0.63 g/kg BEC粉末并溶于150 mL水罐中, 使其通过饮水摄取。将大鼠置于正常光周期下饲养一周以适应环境, 自由饮水、摄食, 饲料为普通基础饲料。之后将其分为3组, Control组(CON组, $n=10$, 正常光周期和自由饮食)、抑郁组(CUMS组, $n=10$, 对大鼠进行慢性温和不可预见性刺激, 使其诱导为抑郁症大鼠)、抑郁+补充BEC组(CUMS+BEC组, $n=10$, 对大鼠进行慢性温和不可预见性刺激, 同时外源补充BEC)。对造模后动物进行行为学检测, 剔除诱导失败的动物。动物饲养方案符合国家《实验动物管理条例》, 动物实验通过浙江工业大学伦理委员会批准。

实验结束后, 在ZT8和ZT16分别对3组大鼠解剖取样。用戊巴比妥钠麻醉后, 颈动脉取血, 暗期取样操作均在红灯下进行, 取得下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)、肝脏、脂肪组织, 迅速冷冻于液氮中, 随后组织样品于 -80 °C冰箱中保存。

1.2 构建慢性温和不可预知性刺激抑郁模型

通过慢性温和不可预知性刺激构建抑郁大鼠模型, 模型诱导期间, 大鼠每天接受1~2种不同的应激, 其中包括: 禁水、空水罐、潮湿垫料、持续照明、倾斜(45°)鼠笼、拥挤(4只/笼)、白噪音以及冷水游泳(13 ± 1 °C, 5 min), 应激持续3周。

1.3 糖水偏好实验

在模型构建期间, 每周进行糖水实验。每次实验前禁水4 h。实验持续2 d, 第1 d, 所有实验动物给予一瓶150 mL 2%的蔗糖水和一瓶150 mL的纯水, 持续1 d。第2 d, 糖水浓度变为5%, 并且两瓶水的位置互换(左右互换), 测定1 h内糖水和纯水的消耗量^[18]。糖水偏好的计算公式为: 糖水偏好=糖水消耗量/(糖水消耗量+纯水消耗量) $\times 100\%$ ^[19]。

1.4 旷场实验

实验装置为45 cm $\times$ 45 cm $\times$ 45 cm的无盖塑料黑色方箱, 在箱子的底面用白线划分成15 cm $\times$ 15 cm的9个方格。实验在隔音房间内进行, 对所测大鼠均为新环境。将模型前和CUMS处理后的大鼠置于木箱中心方格内, 用摄像头观察大鼠5 min内活动情况,

用Any-maze软件进行分析。观察指标为: 动物穿越底面的格数(以4爪均进入方格记数)和动物的直立次数。

1.5 血液指标检测

将解剖所得全血立刻于4 °C下6 000 r/min离心5 min(Eppendof AG centrifuge 5804R), 取上层血清, 放入-40 °C冰箱保存。血清中5-羟色胺、皮质酮、多巴胺的含量用ELISA试剂盒(上海源叶生物科技有限公司)进行检测, 全部操作严格按照说明书进行。

1.6 RNA提取与浓度测试

用TRIZOL Reagent(TaKaRa)提取组织中总RNA(按说明书步骤操作)。用超微量紫外可见分光光度计(Ultrospec 4300 pro)测定260 nm与280 nm波长的光密度值, 计算其比值与RNA浓度。

1.7 逆转录和荧光定量PCR

用TOYOBO公司的反转录试剂盒进行反转录操作。反转录反应体系包括: 0.5 μL Random Primer、0.5 μL dNTP Mixture、2 μL 5×ExScript Buffer以及65 °C预变性后的总RNA, 将上述各试剂充分混匀, 37 °C水浴15 min, 98 °C 5 min以终止反应。荧光定量PCR反应体系如下: 前引物(Forward)和后引物(Reverse)各0.4 μL、5 μL SYBR Premix Ex Taq

(2×)、1 μL模板cDNA、体系用H₂O补足到10 μL(按TOYOBO公司试剂盒)。Real-time PCR反应在Real-time System(Mastercycler eppendorf realplex)中进行, 反应程序如下: 95 °C预变性1 min; 95 °C退火15 s, 60 °C延伸1 min。反应持续40个循环后结束。引物序列见表1。基因的相对表达量使用2^{-ΔΔCt}法比较阈值循环数(Ct)进行分析。各个基因的相对表达量通过管家基因3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydro genase, *GAPDH*)进行标准化校正。

1.8 行为活动监测

对9只实验前和诱导抑郁模型后的SD大鼠(3只/组)进行行为活动分析。每只大鼠单独饲养在一个笼子内, 笼子的正上方有红外探头, 通过红外探头将接收后的数据传输到一台装有CompACTAM软件的电脑上(Activity Monitoring System, Muromachi, Tokyo, Japan), 数据每5 min采集一次。行为活动检测持续3 d左右, 实验结束后分析采集数据。

1.9 数据分析

实验数据使用Statview 5.0 Software软件进行分析, 结果均以平均值±标准误差(mean±S.E.M.)表示。应用单因素方差分析进行统计分析, *P*<0.05表示差异具有显著性。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences used for PCR amplification

基因名称 Gene	基因序列 Accession number	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	
<i>GAPDH</i>	NM017008	Forward	GAC AAC TTT GGC ATC GTG GA
		Reverse	ATG CAG GGA TGA TGT TCT GG
<i>Bmal1</i>	NM024362	Forward	TGC GAT GTC CCG GAA GTT AGA TA
		Reverse	TCA TCG GAT AGA GAT GTT GGC TTG
<i>Cry1</i>	NM198750	Forward	CGA CGA CCA TGA TGA GAA GT
		Reverse	ACA ACC GAA GCG GAG ATA AG
<i>Per1</i>	AB092976	Forward	TGG TAA AGC ACC AGG GAC AAC
		Reverse	GAA GGA CTT TGG CCT TGA ATG TAC
<i>Per2</i>	NM031678	Forward	TGG GAA ACA CCA CGA GAA TG
		Reverse	GTG CGG AAT CGA ATG GGA GA
<i>Rev-erba</i>	M25804	Forward	ACA GCT GAC ACC ACC CAG ATC
		Reverse	CAT GGG CAT AGG TGA AGA TTT CT
<i>Dec1</i>	AB096137	Forward	CCA GGA AAC CAT TGG ACT CAG
		Reverse	AGA GGT CGG ATA CCA GCA TTT
<i>NPAS</i>	NC034201	Forward	GCA ACA CTC GGA AAC TGG AC
		Reverse	CAA CAA TGA CGA AGC CAT CT
<i>GSK-3β</i>	NC000082	Forward	CAT CCT TAT CCC TCC TCA CG
		Reverse	AGA AGC GGC GTT ATT GGT CT

Bmal1、*Cry1*、*Per1*、*Per2*、*Dec1*、*Rev-erba*、*NPAS*、*GSK-3β*这8个基因是目的基因, *GAPDH*是管家基因。
Bmal1, *Cry1*, *Per1*, *Per2*, *Dec1*, *Rev-erba*, *NPAS*, *GSK-3β* are the target genes, *GAPDH* is the housekeeping gene.

2 结果

2.1 BEC对抑郁症模型大鼠体重的影响

在模型诱导期间, 定期测量3组大鼠体重。在整个实验过程中, 3组大鼠的体重都有逐渐上升的趋势, 且不同处理组间有显著差异(图1A)。进一步的分析表明, 从诱导的第1周开始, CON组体重显著高于另外2个实验组, CUMS+BEC组大鼠的体重略高于CUMS组大鼠体重, 但没有显著性差异。

2.2 BEC对抑郁症模型大鼠糖水偏好性的影响

每周对大鼠进行一次糖水偏好实验, 经诱导3周后, 糖水偏好实验结果如图1B所示。CON组大鼠的糖水消耗量为81.3%, CUMS组大鼠对于糖水的消

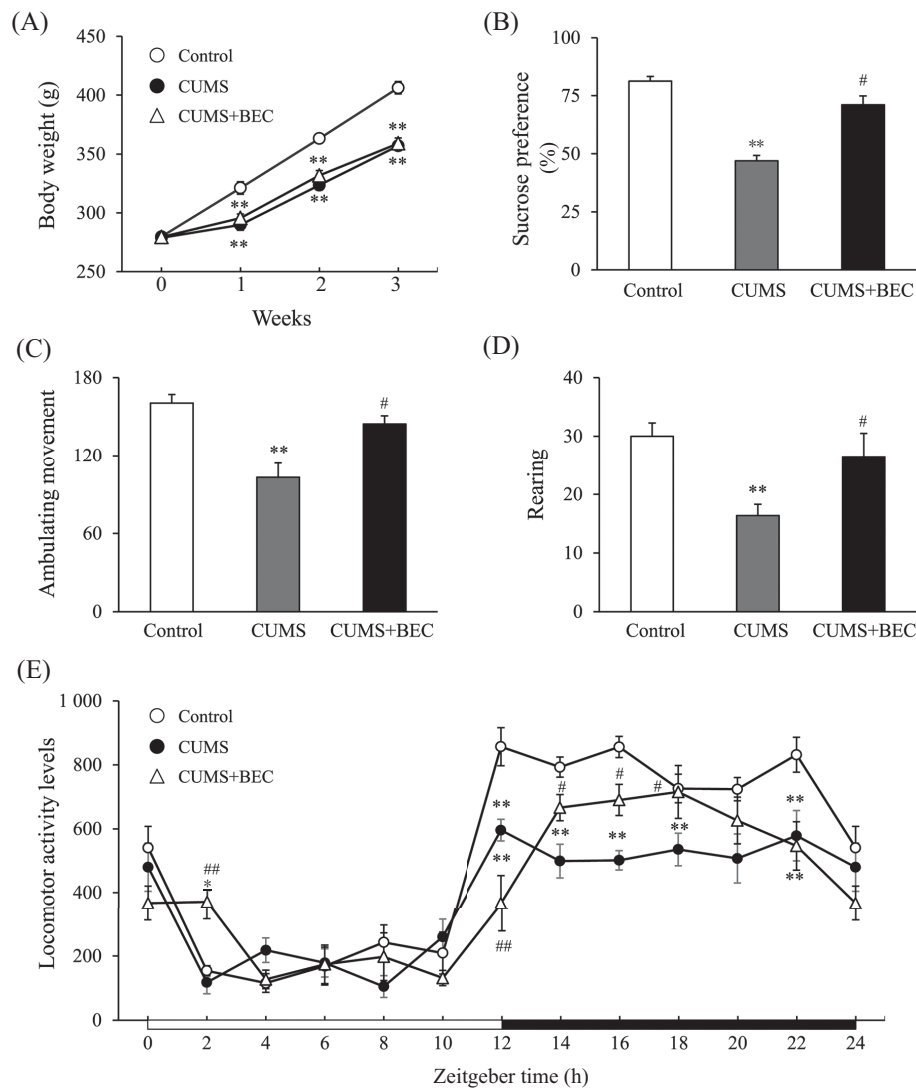
耗量则为46.9%, 显著低于CON组的水平($P<0.01$)。此外, CUMS+BEC组糖水消耗量为71.1%, 显著地高于CUMS组($P<0.01$), 而与CON组相比差异不显著。

2.3 BEC对抑郁症模型大鼠旷场实验的影响

在诱导模型实验前, 大鼠的水平穿越格数和直立次数在各组之间没有显著性差异($P>0.05$)。通过CUMS诱导3周后, CUMS组大鼠较CON组大鼠的水平穿越格数(图1C)和直立次数(图1D)均出现显著性减少($P<0.05$), 而BEC的摄取能显著缓解CUMS处理大鼠探索性活动行为的下降, 使其更接近于CON组。

2.4 BEC对抑郁症模型大鼠行为活动量的影响

模型组诱导3周后, 对3组大鼠的自主行为活动



A: 大鼠体重变化; B: 糖水消耗量; C: 水平穿越格数; D: 直立次数; E: 行为活动量, 图中黑白条代表表明暗光周期。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与CON组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与CUMS组比较。

A: change of body weight; B: sucrose preference; C: ambulating movement; D: rearing; E: locomotor activity, white/black bar indicate the light/dark cycle. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs CON group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs CUMS group.

图1 BEC对抑郁模型大鼠体重及行为的影响

Fig.1 Effect of BEC on depression rats weight and behaviors

进行分析, 结果表明, 不同处理间差异显著。进一步的分析发现, 除ZT2这个时间点外, 3组大鼠的活动量在静息期(光照期)并没有显著差异, 然而在活动期(黑暗期)的ZT12至ZT22期间, CUMS组大鼠在每个时间点的活动量均显著地低于CON组, 而BEC摄取能显著地缓解CUMS处理对大鼠行为活动量的影响(图1E)。

2.5 BEC对抑郁症模型大鼠相关血液指标的影响

大鼠血清中五羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、皮质酮(corticosterone, CORT)、多巴胺(dopamine, DA)和去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)的检测结果如图2所示。与对照组相比, CUMS处理显著降低了ZT8和ZT16时5-HT含量($P<0.05$, 图2A), 但显著提高了ZT8和ZT16时的CORT含量($P<0.01$, 图2B)。而BEC摄取显著提升了ZT16时5-HT的含量($P<0.05$), 并且有效地抑制了CUMS处理所引起的ZT16时CORT含量的上升。此外, 3组大鼠血清的DA含量在ZT8和ZT16均没有明显差异($P>0.05$), 但CUMS+BEC组白天和黑夜节律表达时相与CON组较为一致(图2C)。在ZT8时, CUMS处理引起了NE水平的显著下降, 服用BEC后NE水平得到恢复, 而在ZT16时, 各组间NE的水平无明显差异(图2D)。

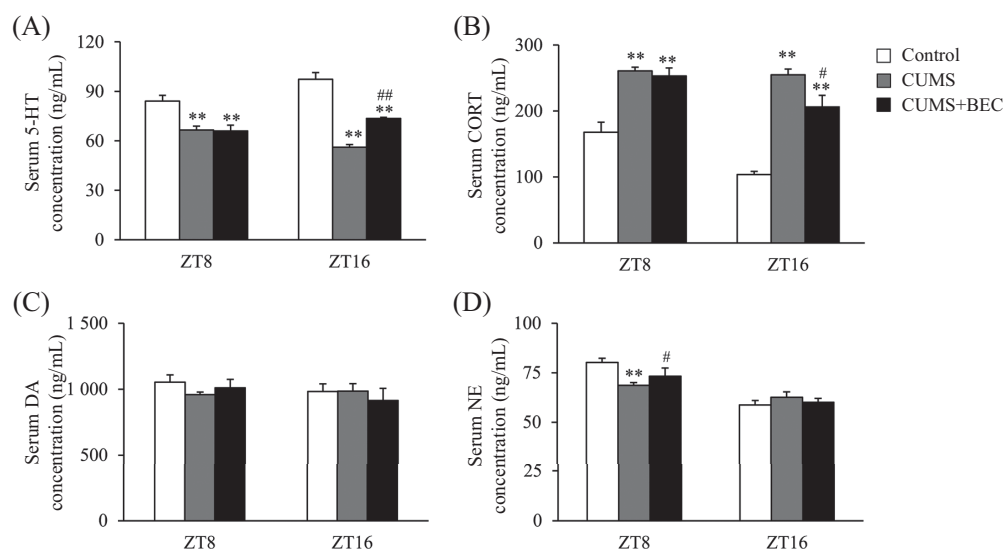
2.6 BEC对抑郁症大鼠下丘脑视交叉上核中生物钟相关基因表达的影响

外源性补充BEC后, 大鼠抑郁症状以及相关

激素分泌均得到了改善, 我们接下去研究了BEC对抑郁大鼠生物节律的影响。大鼠SCN中基因表达变化情况如图3所示, 在ZT8时, CUMS组大鼠SCN中生物钟核心基因*Bmal1*(brain and muscle ARNT-like 1)、*Cry1*(cryptochrome 1)、*GSK-3 β* (glycogen synthase kinase-3 beta)基因表达量都显著高于CON组($P<0.05$), *Rev-erba*(nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1)基因则相反($P<0.05$); 在ZT16时, CUMS组大鼠*Dec1*(deleted in esophageal cancer 1)、*Per2*(period 2)表达量显著低于CON组和CUMS+BEC组($P<0.05$)。而服用BEC的抑郁症模型大鼠, 在ZT8时*Bmal1*、*Cry1*、*GSK-3 β* 基因表达下降($P<0.05$); ZT16时*Dec1*、*Per2*基因表达量上升($P<0.05$), 与CON组表达类似。此外, 在ZT8时, CUMS+BEC组中*NPAS*(neuronal PAS domain-containing protein)基因表达较CON组以及CUMS组呈显著性下降; 而在ZT16时与CUMS组相比无显著性差异。

2.7 BEC对抑郁症模型大鼠肝脏中生物钟相关基因表达的影响

肝脏中基因表达变化情况如图4所示。在ZT8时, CUMS组中*Bmal1*、*Rev-erba*、*Dec1*、*Per2*、*NPAS*、*GSK-3 β* 基因表达量都显著低于CON组($P<0.05$); 而在ZT16时, CUMS组中*Cry1*、*Per1*、*Per2*、*NPAS*基因表达量与CON组有显著性差异($P<0.05$), BEC显著地升高了*Cry1*、*Per2*基因表达量, 降低了*NPAS*基

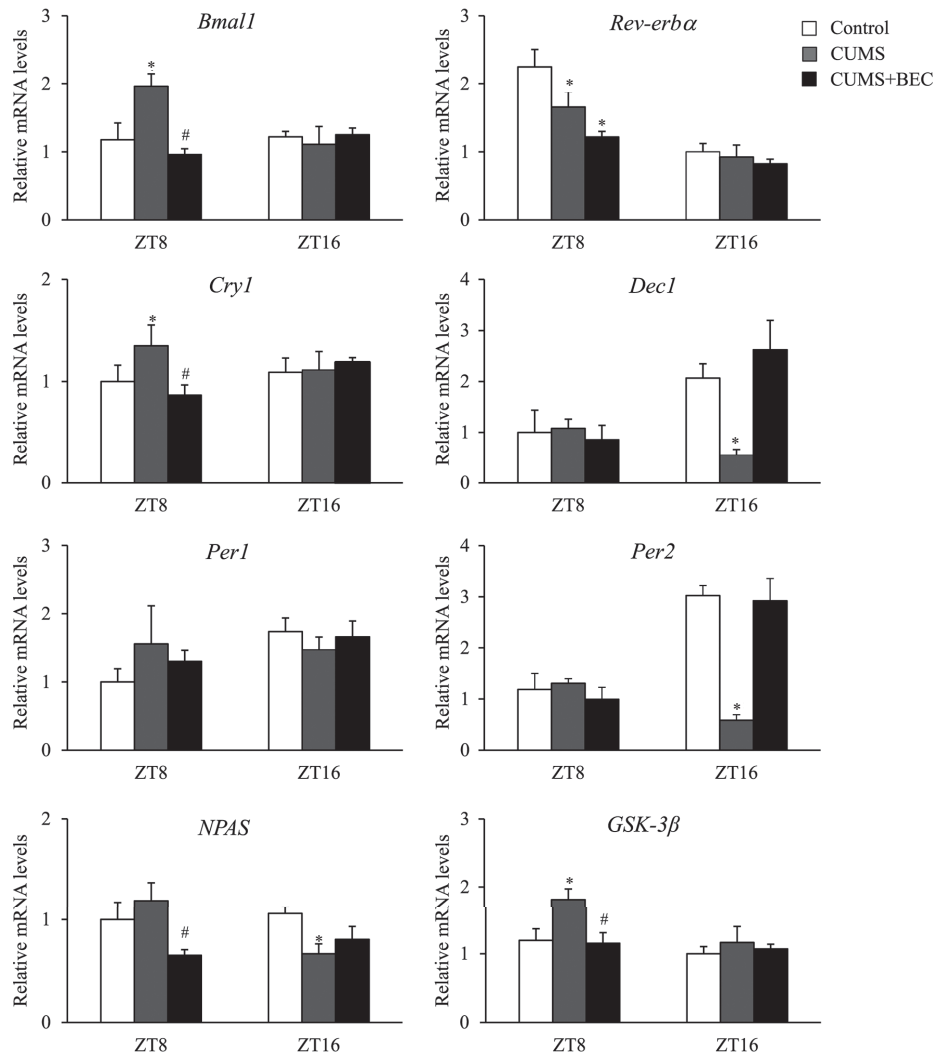


A~D: 分别为血清中5-羟色胺、皮质酮、多巴胺和去甲肾上腺素水平。 ** $P<0.01$, 与CON组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与CUMS组比较。

A-D: 5-hydroxytryptamine, corticosterone, dopamine and norepinephrine levels in serum, respectively. ** $P<0.01$ vs CON group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs CUMS group.

图2 BEC对抑郁症模型大鼠血液指标的影响

Fig.2 Effect of BEC on plasma indicators of depression model rats



* $P < 0.05$, 与CON组比较; # $P < 0.05$, 与CUMS组比较。

* $P < 0.05$ vs CON group; # $P < 0.05$ vs CUMS group.

图3 BEC对抑郁症大鼠SCN中生物钟相关基因表达的影响

Fig.3 Effect of BEC on clock relevant genes expression of SCN in depression model rats

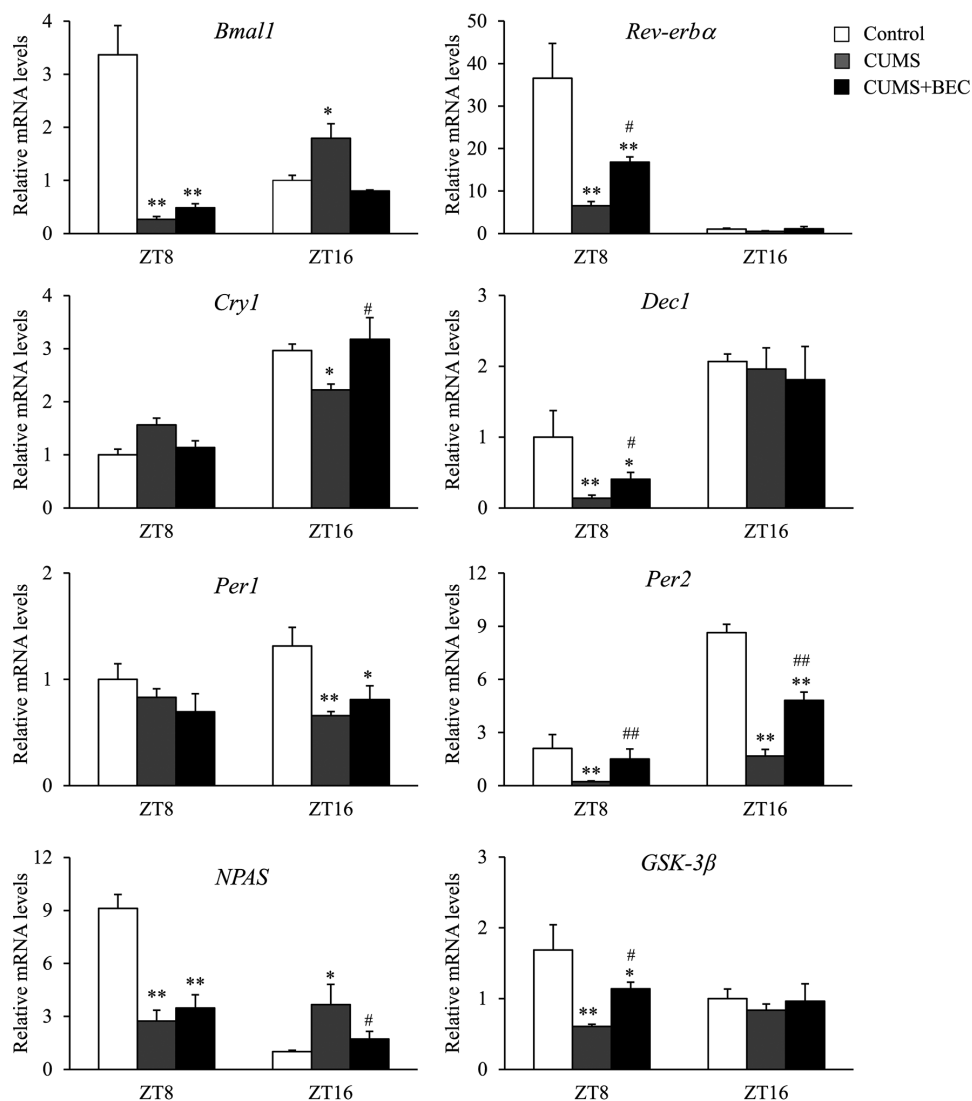
因表达量($P < 0.05$)。此外,服用BEC也使得在CUMS组中所见的*Per1*、*NAPS*、*GSK-3β*基因的异常节律表达模式基本恢复到正常水平。

2.8 BEC对抑郁症模型大鼠脂肪组织中生物钟相关基因表达的影响

大鼠脂肪组织中基因表达水平变化情况如图5所示。在ZT8时,除*Dec1*在CUMS组中表达显著上升,而添加BEC后表达恢复到与CON组相似外,其他基因无明显差异;而在ZT16时,CUMS组中除了*Per2*基因外,其他被测基因都显著低于CON组($P < 0.05$)。但在CUMS+BEC组中,外源补充BEC不仅升高了在ZT16时的*Bmal1*、*Rev-erba*、*Cry1*、*Per1*、*NAPS*和*GSK-3β*基因表达量,而且还改善了*Dec1*、*Per1*、*GSK-3β*基因的节律表达模式,使得更接近CON组。

3 讨论

本研究采用CUMS的方式来构建抑郁症大鼠模型,此模型是目前应用最为广泛和经典的模型之一^[20],它更为近似地模拟了人在生活中受到各种应激后所形成的抑郁症。经过21天的慢性温和应激后,CUMS组大鼠的体重显著低于正常大鼠;同时,水平穿越格数、直立次数明显减少,说明模型诱导使得大鼠探索性行为活动下降。此外,CUMS组大鼠的糖水率显著降低。这些结果与临床抑郁症患者所表现的兴趣丧失、社会交往能力下降等有很大程度的相似性^[21]。此外,本研究还发现,抑郁大鼠血清中的激素水平异常,这与前人的研究结果也相一致^[22]。综上所述,本研究已成功构建抑郁症模型大鼠。通过外源性服用BEC后,显著地缓解了由CUMS所引



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与CON组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与CUMS组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CON group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs CUMS group.

图4 BEC对抑郁大鼠肝脏中生物钟相关基因表达的影响

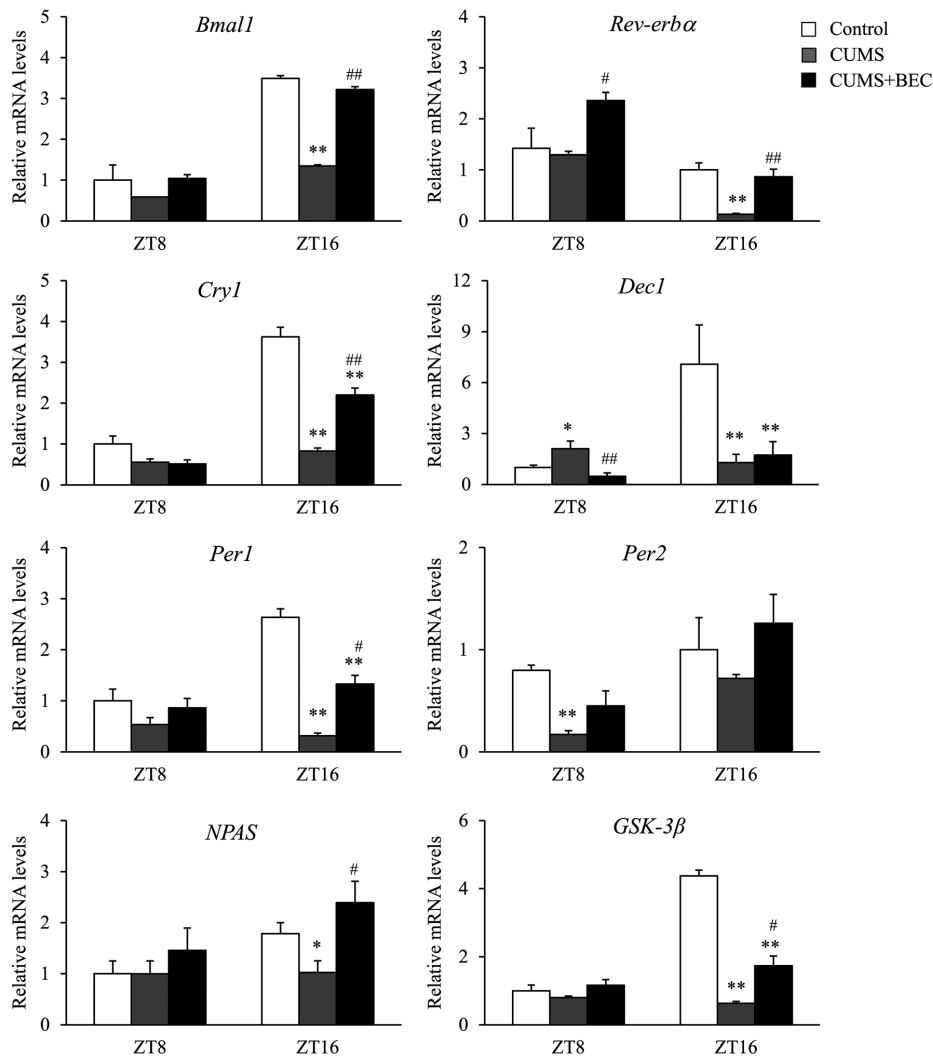
Fig.4 Effect of BEC on clock relevant genes expression of liver in depression model rats

起的大鼠探索行为下降,改善了快感丧失行为。

目前,研究已发现单胺类递质系统是诱发抑郁的重要因素,如5-HT可在抑郁症的发生、发展过程中起到关键作用^[23]。本研究结果发现,服用BEC能抑制由CUMS所致的ZT16时5-HT含量下降。有研究表明,连续3 d口服BEC能提高大鼠脊髓液中5-羟吲哚乙酸水平,而5-羟吲哚乙酸水平能反应大脑中5-HT水平^[24]。BEC含有人体必需的八种氨基酸,其中色氨酸可在羟化酶作用下生成5-HT,因此, BEC也可能是通过增加色氨酸来调节5-HT的代谢,而色氨酸耗竭能引起抑郁^[25]。此外, 5-HT是褪黑素的前体,在抑郁患者中观察到的低褪黑素水平已被认为是由低5-HT所引起的^[26];但也有研究发现,在抑

郁大鼠中,褪黑素是上升的^[27]。因此,紊乱的褪黑素分泌也可能是导致抑郁的因素之一。

外界的应激会导致HPA轴的功能亢奋,使得皮质酮分泌增加,其水平能反映抑郁症的严重程度^[28]。服用BEC能抑制由CUMS所致的ZT16时的CORT含量上升,使之更接近于CON组的水平。Yamono等^[29]通过对BEC可能的有效成分——L-肌肽的研究发现, L-肌肽可通过组胺H3受体及调节自主神经通路,可直接或间接地降低应激后血液中皮质酮的含量。因此, BEC可能通过组胺H3受体以及自主神经系统调节皮质酮分泌,从而改善抑郁症。此外, Tsuruoka等^[30]在鸡精中提取了二酮呱嗪成分,并且发现二酮呱嗪可提高小鼠海马中5-HT和DA的含量。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与CON组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与CUMS组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CON group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs CUMS group.

图5 BEC对抑郁症大鼠脂肪中生物钟相关基因表达情况

Fig.5 Effect of BEC on clock relevant genes expression of adipose tissue in depression model rats

在CUMS组中,检测的3个血清激素昼夜节律表达模式与CON组相反,而其在CUMS+BEC组中的模式相对接近于CON组。此外,CUMS处理引起了NE水平的下降,而NE水平下降或紊乱与抑郁有关^[31],服用BEC可以使NE水平恢复,从而改善抑郁症症状。以上结果表明,BEC对抑郁症大鼠在异常的神经递质的释放方面有一定的调节作用。

BEC的主要成分包括肌肽、鹅肌肽、ProBeytogen和一些矿物质及人体必需氨基酸。研究发现,服用鸡精提取物后海马体和下丘脑中肌肽和鹅肌肽含量上升,从而参与大脑功能的调节,因此,两者可能发挥了缓解抑郁症症状的作用^[32]。此外,鸡精提取物能有效降低由强迫游泳所引起的NE上升,减少大鼠在强迫游泳中的抑郁行为,增加下丘脑中5-羟

色乙酸水平,其主要效应成分可能是肌肽^[33]。小鼠口服肌肽后,不仅能恢复应激引起的肝脏和肌肉中葡萄糖耐量紊乱和糖原含量的下降,而且也能降低血浆皮质酮水平,其机制可能是肌肽通过间接作用影响组胺能神经元系统^[34]。肌肽可以转化成组氨酸,并且作用于组胺能神经元系统以缓解压力引起的损伤^[35-36],调节应激激活的HPA轴,发挥抗应激作用^[37]。此外,肌肽具有抗氧化作用,肌肽的摄入可以减轻由抑郁引起的氧化损伤,从而减轻抑郁症状^[38]。ProBeytogen神奇肌肽作为一个独特的生物活性肽可以通过调节神经递质的含量(如血清素),能有效地提高脑部的认知能力,因此也参与抑郁症的调节。

生物钟系统在维持机体内在的生理功能方面扮演重要角色。外源补充BEC对抑郁症大鼠生物

钟基因紊乱的表达模式和表达量有明显的改善效应。如在母钟SCN中, *Bmal1*、*Cry1*、*Dec1*和*Per2*基因; 外周组织肝脏和脂肪中, *Bmal1*、*Per2*、*NPAS*、*GSK-3 β* 基因使得CUMS+BEC组的核心生物基因的表达规律较CUMS组更加接近CON组。在生物钟分子机制的反馈回路中, CLOCK/NPAS与BMAL1形成的CLOCK/BMAL1或NPAS/BMAL1二聚体与E-box结合, 调控*Per*和*Cry*基因表达, 同时抑制依这些异源二聚体启动的*Rev-erba*、*Dbp*等基因的转录, 影响下游一系列钟控基因的表达^[39-41]。Mongrain等^[42]研究指出, 在睡眠紊乱的小鼠中, BMAL1/CLOCK和NPAS结合到*Per1*和*Dbp*启动子上的程度发生了显著的变化。有研究报道, 低剂量的氯胺酮可以快速地改善抑郁症的病情, 其机制可能是通过调节BMAL1/CLOCK(NPAS)的功能, 从而改善核心生物钟的节律变化^[43]。不仅核心生物钟驱动元件的突变会导致抑郁的产生, 转录翻译后的修饰异常也会引起抑郁相关病状。如*GSK-3 β* 基因可以磷酸化PER2, 该基因过度表达会造成小鼠情绪暴躁^[44]。*Per1*、*Per2*基因突变可以导致昼夜节律表型发生改变, 增加焦虑相关的行为活动^[45]。前期研究发现, BEC可以促进机体母钟与子钟的偶联, 加快生物钟的重置, 从而使得机体更好地适应外界环境^[4], 且其作用主要是通过肌肽来实现的^[46]。因此, 抑郁症大鼠外源服用BEC, 缓解了核心生物钟表达节律的紊乱, 使得机体能更快适应外界环境给予的应激条件, 达到一定的抗抑郁效果。

除了以上所阐述的相关因素外, 神经系统可塑性的损害也参与抑郁症发病的病理过程, 许多抗抑郁药物的机理就是通过促进神经元的可塑性和增强神经元活力来实现效应的^[47]。糖原合酶-3(*GSK-3*) 在脑中高度表达, 参与了许多神经元可塑性调节有关的信号转导通路, 在神经元可塑性的调节中起着重要作用^[48]。近期也有研究表明, *GSK-3 β* 抑制剂能加快抗抑郁药物产生作用的时间^[49], 说明*GSK-3 β* 的可能通过调节神经系统, 从而进一步参与抑郁症的调节。本研究发现, 在SCN中CUMS组大鼠*GSK-3 β* 的表达量显著地高于CON组, 而同时外源服用BEC可降低其表达。因此, BEC可能通过*GSK-3 β* 间接参与抑郁症的调控。

本研究通过3周CUMS处理诱导抑郁症大鼠, 抑郁症大鼠的体重及行为活动量下降, 血清中5-TH水

平下降, 皮质酮水平升高, 昼夜生物节律表达模式紊乱。BEC作为一种功能性食品, 在CUMS诱导抑郁症大鼠同时补充BEC, 可在一定程度上减轻抑郁症状, 其机制可能是通过耦合生物钟母钟与子钟的表达节律来影响神经递质等的合成释放。将来进一步的研究, 如诱导抑郁症后利用BEC进行治疗以及不同剂量的BEC治疗实验会有助于进一步阐明BEC的作用机制, 并且有助于探索BEC作为预防和缓解抑郁症发生的潜在可能性。

参考文献 (References)

- 1 江常莺, 王瑾敏. 抑郁症的病因研究进展. 中西医结合心脑血管病(Jiang Changying, Wang Jinmin. Progress of the etiology of depression. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardiovascular) 2014; 12(1): 90-2.
- 2 Gu L, Xie JJ, Long JX, Chen Q, Pan R, Yan Y, *et al.* Epidemiology of major depressive disorder in mainland china: A systematic review. PLoS One 2013; 8(6): e65356.
- 3 Schoepf D, Uppal H, Potluri R, Chandran S, Heun R. Comorbidity and its relevance on general hospital based mortality in major depressive disorder: A naturalistic 12-year follow-up in general hospital admissions. J Psychiatr Res 2014; 53(3): 28-35.
- 4 Hickie IB, Rogers NL. Novel melatonin-based therapies: Potential advances in the treatment of major depression. Lancet 2011; 378(9791): 621-31.
- 5 Schaeffler J, Ronovsky M, Savalli G, Cabatic M, Sartori SB, Singewald N, *et al.* Fluoxetine normalizes disrupted light-induced entrainment, fragmented ultradian rhythms and altered hippocampal clock gene expression in an animal model of high trait anxiety-and depression-related behavior. Ann Med 2015; 48(1/2): 17-27.
- 6 Pinho M, Sehmbi M, Cudney LE, Santanna MK, Magalhaes PV, Reinares M, *et al.* The association between biological rhythms, depression, and functioning in bipolar disorder: SD large multi-center study. Acta Psychiatr Scand 2016; 133(2): 102-8.
- 7 Bunney BG, Bunney WE. Mechanisms of rapid antidepressant effects of sleep deprivation therapy: Clock genes and circadian rhythms. Biol Psychiatry 2013; 73(12): 1164-71.
- 8 Rao U. DSM-5: Disruptive mood dysregulation disorder. Asian J Psychiatr 2014; 11: 119-23.
- 9 黄耀伟, 于 涟. 生物钟机制进展. 生命科学(Huang Yaowei, Yu Lian. Advance of clock mechanism. Chinese Bulletin of Life Sciences) 2000; 12(1): 10-3.
- 10 Cheung AH, Levitt AJ. Efficacy of bright light treatment, fluoxetine, and the combination in patients with nonseasonal major depressive disorder: A randomized clinical trial. JAMA Psychiatry 2015; 73(1): 1-9.
- 11 Huang WC, Lin CJ, Chiu CC, Lin YT, Huang WK, Huang HY, *et al.* Chicken essence improves exercise performance and ameliorates physical fatigue. Nutrients 2014; 6(7): 2681-96.
- 12 Benton D, Young H, Carter N. The effect of chicken extract on mood, cognition and heart rate variability. Nutrients 2015; 7(2): 887-904.
- 13 Li YF, He RR, Tsol B, Kurihara H. Bioactivities of chicken

- essence. *J Food Sci* 2012; 77(4): R105-10.
- 14 Wu T, Watanabe H, Hong LK, Ni YH, Fu ZW. Effect of BRAND's essence of chicken on the resetting process of circadian clocks in rats subjected to experimental jet lag. *Mol Biol Rep* 2011; 38(3): 1533-40.
- 15 Wu T, Tao YL, Tsang F, Abe K, Xu L, Jiang QR, *et al.* The effect of L-carnosine on the circadian resetting of clock genes in the heart of rats. *Mol Biol Rep* 2015; 42(1): 87-94.
- 16 Wu Tao, Yao CC, Tsang F, Huang LF, Zhang WJ, Jiang JJ, *et al.* Facilitated physiological adaptation to prolonged circadian disruption through dietary supplementation with essence of chicken. *Chronobiol Int* 2015; 32(10): 1-11.
- 17 Kumar B, Kuhad A, Chopra K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: Behavioral and biochemical evidences. *Psychopharmacology* 2011; 214(4): 819-28.
- 18 袁 铭, 刘丽京, 徐凌志, 郭田友, 岳晓东, 李素霞. 环境应激对雄性大鼠抑郁样行为及皮质酮和褪黑素昼夜节律的影响. *生理学报*(Yuan Ming, Liu Lijing, Xu Lingzhi, Xu Lingzhi, Guo Tianyou, Yue Xiaodong, Li Suxia. Effects of environmental stress on the depression-like behaviors and the diurnal rhythm of corticosterone and melatonin in male rats. *Acta Physiologica Sinica*) 2016; 68(3): 215-23.
- 19 Pothion S, Bizot JC, Belzung C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res* 2004; 155(1): 135-46.
- 20 Willner P. Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. *Neurobiol Stress* 2016; 6: 68-77.
- 21 张加强, 刘飞虎, 张 燕, 张 曼. 抑郁症36例患者5-HT, NE, DA水平检测及临床意义. *陕西医学杂志*(Zhang Jiaqiang, Liu Feihu, Zhang Yan, Zhang Man. 5-HT, NE, DA levels in 36 patients with depression and clinical significance. *Shaanxi Medical Journal*) 2014; 43(4): 467-8.
- 22 Morris MC, Rao U, Garber J. Cortisol responses to psychosocial stress predict depression trajectories: Social-evaluative threat and prior depressive episodes as moderators. *J Affect Disord* 2012; 143(1/2/3): 223-30.
- 23 朱 敏. 浅谈抑郁症的病因学研究. *当代医药论丛*(Zhu Min. Study of etiology of depression. *Contemporary Medicine Forum*) 2015; 13(9): 158-9.
- 24 Xu CL, Sim MK. Effects of oral feeding of essence of chicken on the level of 5-hydroxyindole acetic acid in the cerebrospinal fluid of the rat. *Int J Food Sci Nutr* 2009; 48(2): 113-7.
- 25 梁 姗, 王 涛, 胡 旭, 李 薇, 金 锋, 王 沂. 微生物与行为和精神疾病. *心理科学进展*(Liang Sham, Wang Tao, Hu Xu, Li Wei, Jin Feng, Wang Li. Microbiological and behavioral and psychiatric disorders. *Advances in Psychological Science*) 2012; 20(1): 75-97.
- 26 Lewy AJ, Rough JN, Songer JB, Mishra N, Yuhua K, Emens JS. The phase shift hypothesis for the circadian component of winter depression. *Dialogues Clin Neurosci* 2007; 9(3): 291-300.
- 27 Christlansen SL, Hoigaard K, Wiborg O, Bouzinova EV. Disturbed diurnal rhythm of three classical phase markers in the chronic mild stress rat model of depression. *Neurosci Res* 2016; 110: 43-8.
- 28 Connor TJ, Kelly JP, Lenoard BE. Forced swim test-induced endocrine and immune changes in the rat: Effect of subacute desipramine treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 59(1): 171-7.
- 29 Yamano T, Nijim A, Iimori S, Tsuruoka N, Kiso Y, Nagai K. Effect of L-carnosine on the hyperglycemia caused by intracranial injection of 2-deoxy-D-glucose in rats. *Neurosci Lett* 2001; 313(1/2): 78-82.
- 30 Tsuruoka N, Beppu Y, Koda H, Doe N, Watanabe H, Abe K. A DKP cyclo (L-Phe-L-Phe) found in chicken essence is a dual inhibitor of the serotonin transporter and acetylcholinesterase. *PLoS One* 2012; 7(11): 1-10.
- 31 Moret C, Briley M. The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2011; 7(Suppl 1): 9-13.
- 32 Tomonaga S, Hayakawa T, Yamane H, Maemura H, Sato M, Takahata Y, *et al.* Oral administration of chicken breast extract increases brain carnosine and anserine concentrations in rats. *Nutr Neurosci* 2007; 10(3/4): 181-6.
- 33 Inan SY, Yalcin I, Aksu F. Dual effects of nitric oxide in the mouse forced swimming test: Possible contribution of nitric oxide-mediated serotonin release and potassium channel modulation. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 77(3): 457-64.
- 34 Lv YQ, He RR, Watanabe H, Abe K, Sakurai E, Yanai K, *et al.* Effects of a chicken extract on food-deprived activity stress in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74(6): 1276-8.
- 35 Wu XH, Ding MP, Zhu-Ge ZB, Zhu YY, Jin CL, Chen Z. Carnosine, a precursor of histidine, ameliorates pentylentetrazole-induced kindled seizures in rat. *Neurosci Lett* 2006; 400(1/2): 146-9.
- 36 He RR, Yao N, Wang M, Yang XS, Yau CC, Abe K, *et al.* Effects of histamine on lipid metabolic disorder in mice loaded with restraint stress. *J Pharmacol Sci* 2009; 111(2): 117-23.
- 37 Tsoi B, He RR, Yang DH, Li YF, Li XD, Li WX, *et al.* Carnosine ameliorates stress-induced glucose metabolism disorder in restrained mice. *J Pharmacol Sci* 2011; 117(4): 223-9.
- 38 Michel TM, Pülschen D, Thome J. The role of oxidative stress in depressive disorders. *Curr Pharm Des* 2012; 18(36): 5890-9.
- 39 Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res* 2002; 309(1): 47-56.
- 40 Kommedal S, Bodis G, Matkovits A, Csernus V, Nagy AD. Expression pattern of clock under acute phase-delay of the light/dark cycle in the chicken pineal mode. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 172(1): 170-2.
- 41 McClung CA. How might circadian rhythms control mood? Let me count the ways. *Biol Psychiatry* 2013; 74(4): 242-9.
- 42 Mongrain V, Spada FL, Franken P, Curie T. Sleep loss reduces the DNA-binding of BMAL1, CLOCK, and NPAS2 to specific clock genes in the mouse cerebral cortex. *PLoS One* 2011; 6(10): 1-10.
- 43 Bellet MM, Vawter MP, Bunney BG, Bunney WE, Sassonecori P. Ketamine influences CLOCK: BMAL1 function leading to altered circadian gene expression. *PLoS One* 2011; 6(8): 1-7.
- 44 Prickaerts J, Moechars D, Cryns K, Lenaerts I, Craenendonck H, Goris I, *et al.* Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3 β : A putative model of hyperactivity and mania. *J Neurosci* 2006; 26(35): 9022-9.
- 45 Spencer S, Falcon E, Kumar J, Krishnan V, Mukherjee S, Birnbaum SG, *et al.* Circadian genes Period 1 and Period 2 in

- the nucleus accumbens regulate anxiety-related behavior. *Eur J Neurosci* 2013; 37(2): 242-50.
- 46 Wu T, Tao Y, Tsang F, Abe K, Xu L, Jiang Q, *et al.* The effect of L-carnosine on the circadian resetting of clock genes in the heart of rats. *Mol Biol Rep* 2015; 42(1): 87-94.
- 47 Shaw M, Cohen P, Alessi DR. Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216. *Febs Letters* 1997; 416(3): 307-11.
- 48 唐倩倩, 郭小云, 刘 迪, 曹君利. GSK-3 β 参与神经精神疾病的研究进展(Tang Qianqing, Guo Xiaoyun, Liu Di, Cao Junli. *Progress on GSK-3 β participating in neuropsychiatric disorders. Chinese Pharmacological Bulletin* 2014; 30(9): 1193-6.
- 49 Liu RJ, Fuchikami M, Dwyer JM, Lepack AE, Duman RS, Aghajanian GK. GSK-3 inhibition potentiates the synaptogenic and antidepressant-like effects of subthreshold doses of ketamine. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38(11): 2268-77.