



# 雌马酚对慢性束缚致抑郁小鼠模型的改善作用及机制研究

韦震<sup>1,2</sup>, 高荣静<sup>1,3</sup>, 张瑛毓<sup>1</sup>, 孙晶<sup>1</sup>, 卢聪<sup>1</sup>, 王凤忠<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193; 2. 福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350000; 3. 南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095)

**摘要:**为探究雌马酚(S-equol, Eq)对慢性束缚抑郁模型(Chronic Restraint Stress, CRS)小鼠的改善作用, 试验设空白组(Con)、模型组(CRS)、雌马酚低剂量组(Eq-L, 10 mg·kg<sup>-1</sup>)、雌马酚中剂量组(Eq-M, 20 mg·kg<sup>-1</sup>)和雌马酚高剂量组(Eq-H, 40 mg·kg<sup>-1</sup>)共5组处理。预防给药14 d后, 对模型组和雌马酚组进行28 d、10 h·d<sup>-1</sup>的慢性束缚。通过体重监测、空场、糖水偏爱和悬尾试验, 研究慢性束缚应激和雌马酚对小鼠的影响; 检测血清中皮质酮(CORT), 皮层中白介素-6(IL-6)、白介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和过氧化氢酶(CAT)水平, 探究雌马酚的抗抑郁作用机制。行为学结果显示: 与空白组相比, CRS模型组的自主活动能力未受到显著影响( $P>0.05$ ), 但体重和糖水偏爱指数显著下降( $P<0.001$ ), 悬尾中的不动时间显著延长( $P<0.01$ )。与模型组相比, 雌马酚亦未对小鼠的自主活动造成显著影响( $P>0.05$ ), 但显著升高小鼠的糖水偏爱指数并缩短悬尾不动时间( $P<0.05$ )。此外, CRS模型组小鼠血清中CORT显著上调( $P<0.001$ ), 皮层中IL-6、IL-1β、TNF-α和MDA显著升高( $P<0.05$ ), NE、DA、SOD和CAT水平显著降低( $P<0.05$ ), 而雌马酚预防给药显著改善上述异常的指标。研究表明雌马酚可通过抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴的过度亢进、抑制神经炎症、上调神经递质和平衡氧化应激发挥改善抑郁的作用。

**关键词:**雌马酚; 慢性束缚模型; 下丘脑-垂体-肾上腺轴; 炎症因子; 神经递质; 氧化应激

## Protective Effects of S-equol on Chronic Restraint Stress-induced Depressive-like Behavior in Mice

WEI Zhen<sup>1,2</sup>, GAO Rong-jing<sup>1,3</sup>, ZHANG Ying-yu<sup>1</sup>, SUN Jing<sup>1</sup>, LU Cong<sup>1</sup>, WANG Feng-zhong<sup>1</sup>

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, China; 3. College of Food Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** To study the effects of S-equol (Eq) on chronic restraint stress (CRS)-induced depressive-like behavioral in mice and the underlying mechanisms. Mice were randomly divided into control group (Con), CRS model group (CRS), Eq-Low group (Eq-L, 10 mg·kg<sup>-1</sup>), Eq-Medium group (Eq-M, 20 mg·kg<sup>-1</sup>) and Eq-High group (Eq-H, 40 mg·kg<sup>-1</sup>). After pre-administration with Eq for 2 weeks, the CRS group and Eq groups was conducted by continue restraint in 10 hours daily for 28 days. The effects of CRS and Eq on the mice were investigated by body weight (BW), open field test (OFT), sucrose preference test (SPT), and tail suspension test (TST). In addition, corticosterone (CORT) levels in serum as well as interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor α (TNF-α), norepinephrine (NE), dopamine (DA), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and catalase (CAT) levels in cortex of mice were evaluated to explore the molecular mechanism of antidepressant effect. The results of behavioral tests showed that CRS and Eq administration were found to have no influence on the locomotor activity of mice ( $P>0.05$ ) compared to those of control group. However, the body weight and sucrose preference index of the CRS-treated mice was significantly lower than that of control mice ( $P<0.001$ ). At the same time, CRS treatment remarkably increased the immobility time of mice in TST ( $P<0.01$ ). Meanwhile, administration with Eq (10, 20 and 40 mg·kg<sup>-1</sup>) significantly elevated the sucrose consumption percent and decreased the immobility time when compared with the CRS-treated group ( $P<0.05$ ). In addition, CRS treatment significantly increased the levels of CORT in serum ( $P<0.001$ ), decreased the contents of TNF-α, IL-6, IL-1β and MDA ( $P<0.05$ ), and elevated the levels of NE, DA, SOD, and CAT ( $P<0.05$ ) compared to those of control mice. Eq administration significantly reversed these changes of CRS-treated mice. These findings demonstrated that Eq treatment significantly alleviated the depressive-like behavior induced by chronic restraint stress, possessing the antidepressant-like effects. The mechanisms underlying the antidepressant-like effects of Eq may be related to normalize the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), mediate neuroinflammation, elevate the monoamine neurotransmitter levels, and alleviate the oxidative stress.

**Keywords:** S-equol; chronic restraint stress; Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis; inflammatory cytokines; neurotransmitter; oxidative stress

收稿日期: 2021-07-31

**基金项目:** 国家大豆产业技术体系(CARS-04); 国家农业科技创新工程项目(125161015000150013); 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2020-IFST-04); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(S2021JBKY-20); 中国农业科学院基本科研业务费专项(Y2020LM05)。

**第一作者:** 韦震(1996—), 女, 硕士研究生, 主要从事食药同源功能因子挖掘及利用研究。E-mail: liwei1126@126.com。

**通讯作者:** 王凤忠(1972—), 男, 博士, 研究员, 主要从事农产品功能因子挖掘利用研究。E-mail: wangfengzhong@sina.com;

卢聪(1989—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事食药同源功能因子挖掘及利用研究。E-mail: lucong198912@126.com。

雌马酚 (S-equol, Eq) 作为大豆异黄酮的次级代谢产物,具有雌激素样作用、抗氧化作用、抗炎、神经活性等生物活性<sup>[1-4]</sup>。雌马酚更易被肠道吸收且可呈游离形式穿过血脑屏障,因而比大豆异黄酮具有更高的生物活性<sup>[5]</sup>。Ishiwata 等<sup>[6]</sup>发现连续补充雌马酚 12 周可显著改善围绝经期妇女的焦虑症状。Yu 等<sup>[7]</sup>建立缺血再灌注致阿兹海默症大鼠模型探究雌马酚的神经保护作用,发现雌马酚呈剂量依赖性方式恢复大鼠脑组织损伤和神经功能缺损,并下调皮层中磷酸化 Src-Tyr416 (p-Src) 的蛋白水平。此外,本试验室前期建立脂多糖 (LPS) 诱导小鼠抑郁模型,发现雌马酚可通过上调神经递质 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、稳定色氨酸代谢和抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路起到改善抑郁的作用<sup>[8]</sup>。以上研究提示雌马酚具有保护神经的潜力,但在改善抑郁方面的作用值得深入挖掘。

抑郁症是一类以长期心情消沉为主的慢性情绪障碍疾病,表现为情绪低落、入睡障碍、饮食减少等,随着生活节奏的加快、压力的增大,全球范围内抑郁症发病率逐年递增,逐渐成为威胁人类健康的第四大类疾病<sup>[9-10]</sup>。慢性束缚应激模型 (Chronic Restraint Stress, CRS) 作为一种典型的慢性应激动物模型,其基本原理是通过束缚器具限制小鼠的活动,从而引起动物的心理应激<sup>[11]</sup>。CRS 模型非直接将力作用于动物,其对机体无损伤性刺激且与人类身心性疾病的致病过程类似,能更好模拟心理应激,因而广泛应用于筛选抗抑郁药物和功能因子的研究中<sup>[12]</sup>。本研究采用束缚 28 d、10 h·d<sup>-1</sup> 的方法建立诱导小鼠抑郁的 CRS 模型,对雌马酚的抗抑郁功效进行评价,并从下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴 (The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis, HPA) 功能、神经炎症、单胺类神经递质变化及氧化应激水平的角度探索雌马酚发挥抗抑郁作用机制,以期挖掘雌马酚保护神经的作用靶点,为后续产业开发应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 SPF 级 ICR 小鼠 50 只 (雄性, 56 ~ 63 d, 25 ~ 28 g) 由北京维通利华试验动物公司提供,试验小鼠生产许可证号: SCXK (京) 2016-0006。本试验遵守动物福利 3R 原则、符合国际试验动物伦理学要求,并获中国医学科学院药用植物研究所试验动物管理与动物福利委员会 (IACUC) 的审查批准 (批准号: No. SLXD-2021031623)。小鼠自由饮用食水,试验期间室内温度保持在 22 ~ 24 ℃,相对湿度保持在 (55 ± 10) %,保持 12 h 黑

暗/12 h 照明的昼夜节律 (8:00—20:00 亮灯)。

1.1.2 药品及试剂 S-雌马酚,上海麦克林生化科技有限公司 (纯度 ≥ 98%, 批号 S27804); 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na), 国药集团药业股份有限公司 (批号 110429-35-1); 蔗糖, Baomanbio 公司 (批号 57-50-1); 皮质酮 (corticosterone, CORT)、白介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )、去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)、多巴胺 (dopamine, DA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malond-ialdehyde, MDA)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、酶联免疫吸附分析 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒均来自南京建成生物工程研究所。

1.1.3 仪器 5810R 高速冷冻离心机、微量移液器 (德国 Eppendorf 公司); M1000 多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); KQ-600DV 数控超声波清洗器 (昆山舒美公司); 小鼠行为限制器、空场仪 (KSYY-OP-V4.0)、悬尾试验仪 (KSYY-TS-V3.0)、强迫游泳检测仪器 (KSYY-FS-V3.0) 均由中国医学科学院药用植物研究所、中国航天员中心和北京康森益友科技有限公司联合研发。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药 小鼠适应环境 3 d 后,根据体重随机分成 5 组,空白对照组 (Con, 等量羧甲基纤维素钠溶剂<sup>[11]</sup>)、模型组 (CRS, 等量羧甲基纤维素钠溶剂), 雌马酚低剂量组 (Eq-L, 10 mg·kg<sup>-1</sup>)、雌马酚中剂量组 (Eq-L, 20 mg·kg<sup>-1</sup>) 和雌马酚高剂量组 (Eq-L, 40 mg·kg<sup>-1</sup>), 每组 10 只。分组结束后灌胃给药 14 d, 每天上午 9:00 灌胃 1 次, 灌胃体积 0.1 mL·10 g<sup>-1</sup>, 每日灌胃直至行为学检测结束。连续灌胃 14 d 后建立 28 d 的束缚诱导抑郁模型,造模结束后依次进行糖水偏爱试验、空场试验和悬尾试验。

1.2.2 慢性束缚致抑郁模型建立 参考 Wang 等<sup>[13]</sup>建立的方法,将小鼠面朝底部放入行为限制器内,固定塞托,使动物在行为限制器内的活动空间小于其身长,保证头部可自由活动、四肢固定。束缚强度为 10 h·d<sup>-1</sup>, 束缚时间为 22:00—次日 8:00, 束缚期间各组小鼠禁食禁水。

1.2.3 体重检测 每 3 d 称重一次,监测各组小鼠体重变化。

1.2.4 糖水偏爱试验 试验包括糖水训练期 (48 h) 和测试期 (12 h)<sup>[14]</sup>, 试验中动物需单笼饲养,在鼠笼放置水瓶的位置对称处放置另一只水瓶,保证水瓶外观一致,小鼠能够饮用且无漏水现象。训练期第 1 天 (21:00 pm), 给予每只小鼠 2 瓶

蔗糖水(2%),12 h 后交换水瓶位置。训练期第 2 天(21:00 pm),给予每只小鼠 1 瓶蔗糖水(2%)、1 瓶纯水,12 h 后交换水瓶位置。第 3 天(21:00 pm),所有小鼠禁食禁水 12 h。在检测前对 50 只纯水瓶和 50 只 蔗糖水瓶进行编号和称重。第 4 天测试期(9:00—21:00),期间保持试验室环境安静,让动物自由饮水。检测结束后取下所有水瓶,让小鼠恢复正常饮食饮水,按照编号对水瓶称重并计算糖水偏爱指数。

糖水偏爱指数(%) =

$$\frac{\text{糖水饮用量(g)}}{\text{糖水饮用量(g)} + \text{纯水饮用量(g)}} \times 100$$

1.2.5 空场试验 在糖水偏爱试验次日,对小鼠灌胃给药 1 h 后进行空场试验。根据本试验室前期建立的方法,对小鼠的自主活动表现及运动情况进行检测<sup>[15]</sup>。将小鼠面壁边缘放入测试箱内(每次试验从同一位置同一方向放入),适应 3 min 后进行检测,观察统计小鼠在 5 min 测试期间内的自主运动情况。每次检测结束后,对小鼠粪便和尿液进行清理,用 75% 酒精去除气味。

1.2.6 悬尾试验 在空场试验次日,对小鼠灌胃给药 1 h 后进行悬尾试验。参照 Zhang 等<sup>[16]</sup>报道的方法,在小鼠尾巴距尾尖部约 1.0 ~ 1.5 cm 处缠上提前剪好的胶布(胶布约宽 5 mm,长 6 ~ 8 cm),挂在“S”型小铁钩上,使其倒悬体位,其头部距离悬尾箱底面约 5 ~ 10 cm,小鼠挣扎时使得铁钩上的张力变化,该信号由悬尾箱支架上的传感器接收,系统自动记录小鼠不动时间。小鼠倒挂 2 min 适应后进行检测,系统对 4 min 检测期内累计静止时间进行统计(小鼠停止挣扎或静止为不动状态)。每次小鼠试验后,清除粪便尿液并使用 75% 酒精清除气味。

1.2.7 样本采集 试验结束后,小鼠摘眼球采血并处死,在冰上迅速分离皮层、海马等脑组织后存于 -80 ℃ 冰箱备用;血样在室温下静置 30 min 后,3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 取上清液,分装移至 EP 管,置于 -80 ℃ 保存,留待检测。

1.2.8 生化指标检测 皮层在 4 ℃ 生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,称重后加入组织重量 9 倍的 4 ℃ 生理盐水制成 10% 组织匀浆,2 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后取上清液进行测定。根据 Elisa 试剂盒说明书,检测小鼠血清中 CORT 水平、皮层中促炎细胞因子(IL-6、IL-1β 和 TNF-α)的含量、皮层中单胺类神经递质(NE、DA)的含量、皮层内氧化应激因

子(MDA、SOD 和 CAT)水平的含量。

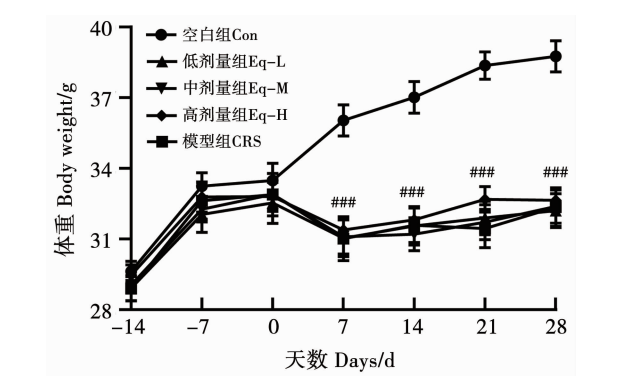
1.3 数据分析

试验数据结果采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,结果以均值 ± 标准误(Mean ± SEM)形式表示。进行单因素方差分析(one-way ANOVA),使用最小显著差数法(LSD)多重比较方法比较组间差异,当 P < 0.05 则认为差异具有统计学意义。使用 Graph Pad Prism 8.0.2 软件作图。

2 结果与分析

2.1 雌马酚对慢性束缚模型小鼠体重的影响

如图 1 所示,在 -14 d 为分组时体重,各组间无显著性差异(P > 0.05)。在 14 d 的灌胃期间(-14 ~ 0 d),各组小鼠体重呈上升趋势,亦未出现差异(P > 0.05)。慢性束缚 7 d 后(7 d),与空白组相比,CRS 模型组及雌马酚给药组体重出现极显著性降低(P < 0.001),该差异持续至造模结束。



注: #, ##和###分别表示与空白组相比,在 P < 0.05, P < 0.01 和 P < 0.001 水平差异显著; \*, \*\*和\*\*\*分别表示与模型组相比,在 P < 0.05, P < 0.01 和 P < 0.001 水平差异显著。下同。

Note: #, # and ### indicate there is significant difference at the levels of P < 0.05, P < 0.01 and P < 0.001 compared with control group respectively; \*, \*\* and \*\*\* indicate there is significant difference at the levels of P < 0.05, P < 0.01 and P < 0.001 compared with the model group respectively. The same below.

图 1 雌马酚对慢性束缚模型小鼠体重的影响  
Fig. 1 The effects of Eq on the body weight of CRS model mice

2.2 雌马酚对慢性束缚模型小鼠糖水偏爱指数的影响

糖水偏爱试验是动物试验中用于评估小鼠“抑郁样”行为的经典试验。如图 2 所示,与空白组相比,模型组小鼠的糖水偏爱度显著下降(P < 0.001),表明小鼠抑郁模型建立成功;与模型组相比,雌马酚给药组(10, 20 和 40 mg·kg<sup>-1</sup>)的糖水偏爱度均显著上升(P < 0.001 或 P < 0.05),其中雌马酚低剂量组(10 mg·kg<sup>-1</sup>)效果最好。

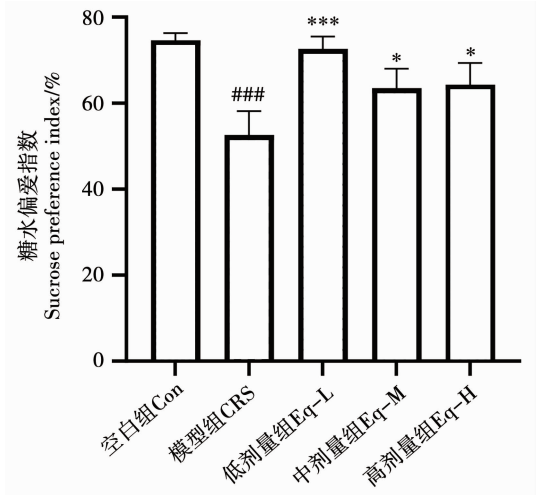


图2 雌马酚对慢性束缚模型小鼠糖水偏爱指数的影响

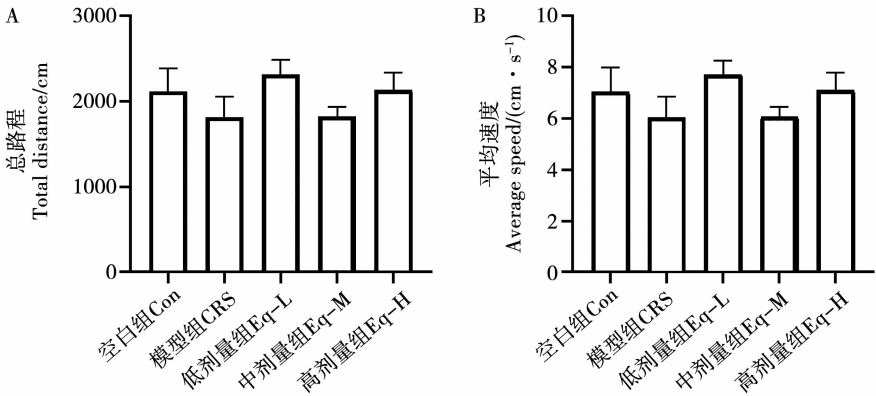
Fig.2 The effects of Eq on sucrose preference index of CRS model mice

2.3 雌马酚对慢性束缚模型小鼠自主活动的影响

如图3所示,各组小鼠的总路程(图3A)和平均速度(图3B)无显著性差异( $P>0.05$ ),模型组和雌马酚中剂量组( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )小鼠的总路程和平均速度仅呈下降趋势,表明28 d的慢性束缚诱导抑郁模型未对小鼠的运动总路程和平均速度产生影响,亦表明雌马酚不影响模型小鼠的自主活动。

2.4 雌马酚对慢性束缚模型小鼠悬尾不动时间的影响

如图4所示,与空白组相比,模型组小鼠的悬尾不动时间显著延长( $P<0.01$ ),表明小鼠出现行为绝望的抑郁行为;与模型组相比,雌马酚低剂量组( $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )小鼠的不动时间显著缩短( $P<0.01$ ),雌马酚中高剂量组小鼠的不动时间仅呈下降趋势,无统计学差异( $P>0.05$ )。雌马酚低剂量组悬尾试验结果与糖水偏爱试验结果一致,效果最优。



注:A. 总路程;B. 平均速度。  
Note: A. Total distance; B. Average speed.

图3 雌马酚对慢性束缚模型小鼠自主活动的影响

Fig.3 The effects of Eq on spontaneous activities of CRS model mice

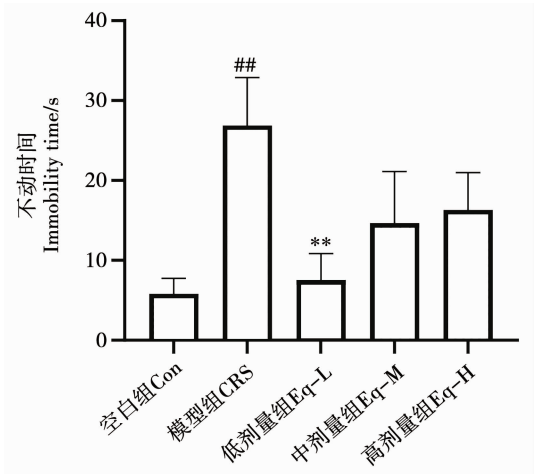


图4 雌马酚对慢性束缚模型小鼠悬尾不动时间的影响

Fig.4 The effects of Eq on immobility time of CRS model mice



2.5 雌马酚对慢性束缚模型小鼠血清皮质酮水平的影响

如图 5 所示,与空白组相比,模型组小鼠血清 CORT 含量显著升高( $P < 0.001$ ),表明模型组小鼠的 HPA 轴被过度激活;与空白组相比,雌马酚给药各组( $10, 20, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )小鼠的血清皮质酮含量显著下降( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ),表明雌马酚可有效干预抑郁小鼠的 HPA 轴功能,使其水平正常化。

2.6 雌马酚对慢性束缚模型小鼠皮层内促炎细胞因子的影响

雌马酚对束缚模型小鼠皮层内促炎细胞因子水平的影响如图 6 所示,与空白组相比,模型组小鼠皮层内 IL-6(图 6A)、IL-1 $\beta$ (图 6B)、TNF- $\alpha$ (图 6C)水平显著升高( $P < 0.001$  或  $P < 0.05$ ),表明模型组小鼠皮层内出现神经炎症;与模型组相比,雌马酚各组( $10, 20, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )给药后小鼠皮层内 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平显著下降( $P < 0.001$  或  $P < 0.01$ ),

表明雌马酚可有效抑制抑郁小鼠脑内的炎症反应。

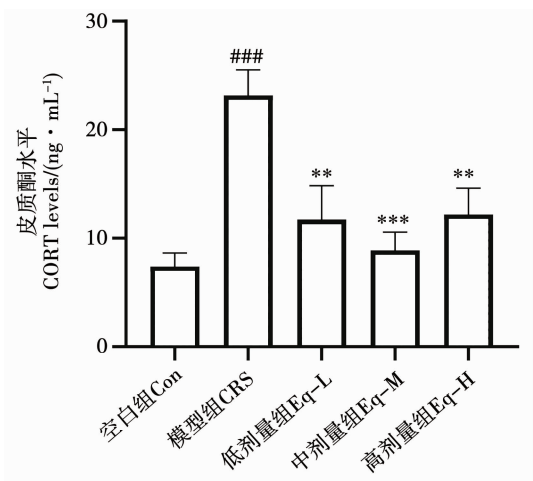
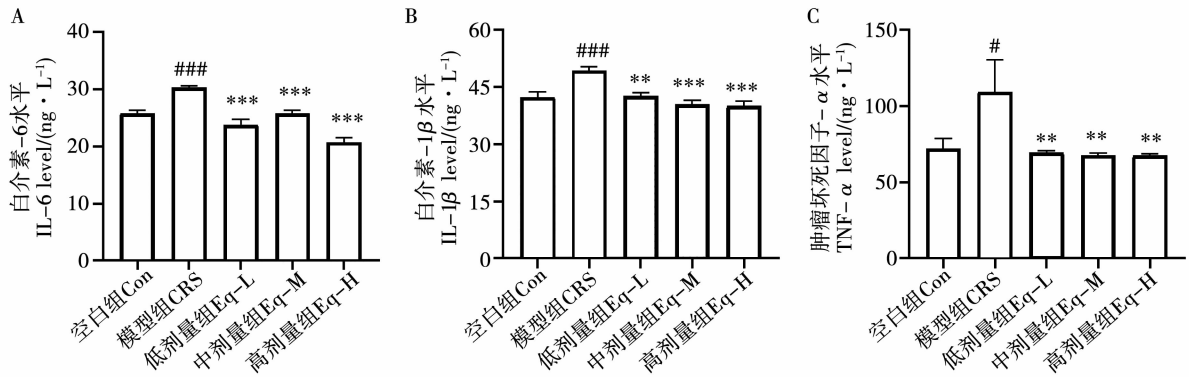


图 5 雌马酚对慢性束缚模型小鼠血清皮质酮水平的影响  
Fig. 5 The effects of Eeq on corticosterone in serum of CRS model mice



注:A. 白介素-6 水平;B. 白介素-1 $\beta$  水平;C. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  水平。  
Note: A. IL-6; B. IL-1 $\beta$ ; C. TNF- $\alpha$ .

图 6 雌马酚对慢性束缚模型小鼠皮层内促炎细胞因子水平的影响

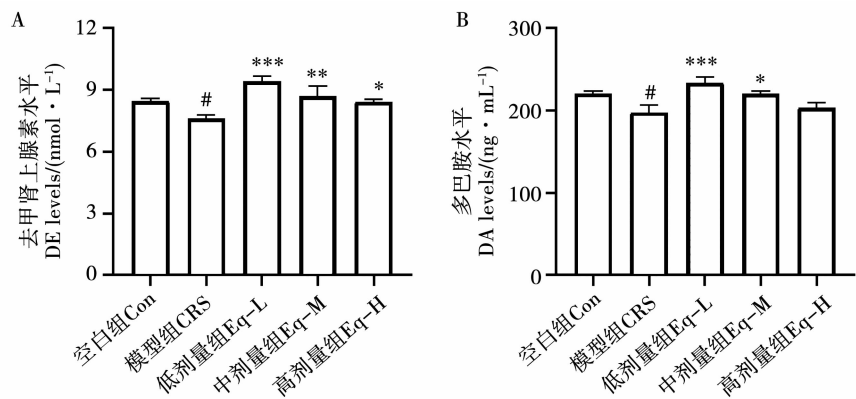
Fig. 6 The effects of Eeq on inflammatory factors in cortex of CRS model mice

2.7 雌马酚对慢性束缚模型小鼠皮层内单胺类神经递质的影响

雌马酚对慢性束缚模型小鼠皮层内单胺类神经递质水平的影响如图 7 所示,与空白组相比,模型组小鼠皮层内 NE(图 7A)、DA(图 7B)水平显著下降( $P < 0.05$ ),从神经递质水平下调的角度表明模型建立成功;与模型组相比,雌马酚各组( $10, 20, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )给药后小鼠皮层内 NE 和 DA 水平显著升高( $P < 0.05, P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ),表明雌马酚可通过上调小鼠脑内神经递质水平起到干预抑郁的作用,其中低剂量效果最好。

2.8 雌马酚对慢性束缚模型小鼠皮层内氧化应激水平的影响

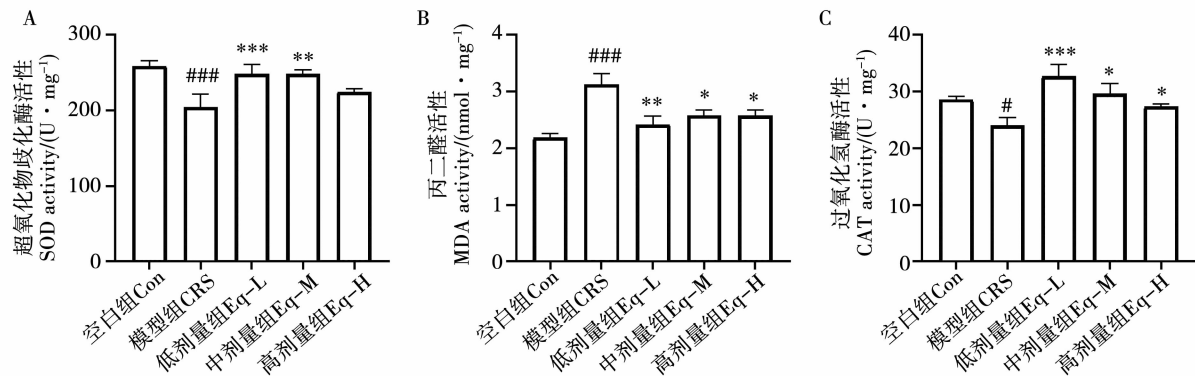
如图 8 所示,与空白组相比,模型组小鼠皮层内 SOD(图 8A)、CAT(图 8C)水平显著下降( $P < 0.001$  或  $P < 0.05$ ),MDA 水平(图 8B)显著升高( $P < 0.001$ ),表明慢性束缚引起小鼠脑内氧化应激水平失调;与模型组相比,雌马酚给药组小鼠皮层内 SOD、CAT 水平显著升高( $P < 0.05, P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ),MDA 水平显著下降( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),表明雌马酚可抑制小鼠皮层内氧化应激水平的紊乱。与以上结果一致,雌马酚低剂量效果最优。



注:A. 去甲肾上腺素;B. 多巴胺。  
Note: A. NE; B. DA.

图 7 雌马酚对慢性束缚模型小鼠皮层内单胺类神经递质水平的影响

Fig. 7 The effects of Eq on monoamine neurotransmitters in cortex of CRS model mice



注:A. 超氧化物歧化酶;B. 丙二醛;C. 过氧化氢酶。  
Note: A. SOD; B. MDA; C. CAT.

图 8 雌马酚对慢性束缚模型小鼠皮层内氧化应激水平的影响

Fig. 8 The effects of Eq on oxidative stress level in cortex of CRS model mice

3 讨论

在建立慢性束缚模拟抑郁模型中,束缚刺激的持续时间、次数、行为限制器具和造模环境等模型建立的关键因素均对动物状态和造模成功率有影响<sup>[17]</sup>。李婷婷<sup>[18]</sup>采用束缚7 d、2 h·d<sup>-1</sup>的方法建立C57BL/6小鼠焦虑模型,发现此种束缚方法可能是通过激活小鼠海马和前额皮层的炎症反应诱导小鼠产生焦虑行为。Chen等<sup>[19]</sup>采用连续束缚14 d、2 h·d<sup>-1</sup>的方法研究束缚模型对小鼠的影响,结果发现CRS可通过降低小鼠海马和内侧前额叶皮质区树突和树突棘密度、上调肌动蛋白结合蛋白(Cofilin 1)表达使小鼠出现抑郁样行为。Lin等<sup>[20]</sup>建立28 d、6 h·d<sup>-1</sup>模型,结果发现CRS可通过抑制MK1-ERK1/2-CREB信号通路诱导ICR小鼠出现抑郁行为。试验室前期比较了束缚周期(14 d、28 d和42 d)以及每日束缚时长(6 h、10 h)对小鼠造模成功率的影响,采用束缚28 d、10 h·d<sup>-1</sup>的方法建立慢

性束缚所致抑郁小鼠模型,探究雌马酚的抗抑郁作用。

体重作为小鼠生长过程中的重要指标,反映了持续束缚刺激对小鼠带来的影响。在束缚刺激前的灌胃期间,各组小鼠体重无显著性差异,呈上升趋势。束缚7 d后,与空白对照组相比,模型组和雌马酚处理组体重呈显著性降低( $P<0.001$ ),这与以往报道一致<sup>[21]</sup>。为排除体重变化对小鼠的自主活动造成影响,在束缚结束后进行空场试验,结果显示各组间无显著性差异。因此,CRS并不影响小鼠的自主活动能力。糖水偏爱试验是基于啮齿动物对甜味的偏好原理而设计的一种检测方法,用以反映抑郁模型小鼠的快感缺失程度。在持续束缚小鼠28 d后,与空白组相比,模型组的糖水偏爱指数显著降低,给予雌马酚可恢复小鼠的糖水偏爱指数。悬尾试验也是经典的评价抑郁程度的指标,小鼠在强迫悬尾时,起初会出现不断挣扎的表现,反复挣扎无望后陷入“绝望”状态,该状态持续的时间

即为不动时间。模型组的不动时间显著延长,雌马酚低剂量组可有效缩短不动时间。模型组小鼠快感缺失、绝望时间延长,且运动能力未产生影响,以上行为学的结果表明 28 d、每日 10 h 的 CRS 模型建立成功,与人类抑郁症发病类似,亦提示雌马酚对 CRS 诱导的小鼠抑郁行为有显著改善作用。

神经内分泌系统失调与抑郁症的发生发展密切相关,机体面对外界的长期刺激时会造成,CORT 水平的持续升高,破坏 HPA 轴的负反馈调节机制使 HPA 轴功能持续亢进,最终导致抑郁发生<sup>[22]</sup>。本研究中 CRS 模型组小鼠血清中 CORT 含量显著升高,提示模型组小鼠的 HPA 轴功能被过度激活,而雌马酚(10,20 和 40 mg·kg<sup>-1</sup>)给药后小鼠血清内 CORT 的含量显著下降,表明雌马酚可能是通过调节 HPA 轴功能发挥抗抑郁作用。

促炎细胞因子水平升高也会促使 CORT 释放增加。在应激源刺激下,机体的免疫细胞迅速激活释放炎症因子,形成更多的促炎介质,交感神经系统和 HPA 轴迅速被激活调控外周炎症反应,最终导致神经炎症的发生<sup>[23]</sup>。HPA 轴为调控炎症反应持续激活,最终加重抑郁症<sup>[24]</sup>。本研究中 CRS 模型组小鼠皮层中的促炎细胞因子 IL-6,IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平显著升高,表明小鼠出现炎症反应,这之前报道一致<sup>[25]</sup>。而雌马酚给药后显著降低了上述炎症因子含量,表明雌马酚可通过抑制神经炎症继而调节 HPA 轴功能发挥抗抑郁和改善认知的作用。

单胺类神经递质假说中,神经细胞突触间隙的单胺类神经递质 5-HT、DA 和 NE 浓度的降低是诱导抑郁症发生的主要原因。本研究中发现 CRS 模型组小鼠皮层内 DA 和 NE 的水平显著下降,而雌马酚给药后显著逆转了这一趋势。这与本试验室前期的研究结果一致,雌马酚可通过上调脂多糖抑郁模型小鼠海马中 NE 和 5-HT 的水平<sup>[11]</sup>。以上均表明雌马酚可能是通过调节脑内单胺类神经递质的含量发挥抗抑郁的作用。此外,体内氧化应激水平的失调在抑郁症等神经精神类疾病的发生发展过程中起着关键作用,可通过 SOD 和 CAT 等抗氧化酶的活性以及脂质过氧化物的产物 MDA 的水平来表示<sup>[26]</sup>。具有抗氧化活性的功能因子被认为可通过抑制氧化应激水平发挥神经保护作用,作为大豆异黄酮这一具有广泛生物学活性的功能因子的代谢产物,雌马酚具有更强的抗氧化能力<sup>[27]</sup>。本研究中,雌马酚减轻了 CRS 诱导小鼠皮层内 SOD 和 CAT 的含量显著降低,且降低 MDA 含量。这与已发表的研究报告一致,即雌马酚可通过减轻氧化应激以改善阿兹海默症等神经退行性疾病<sup>[28-30]</sup>。

## 4 结论

本研究发现雌马酚干预可改善慢性束缚诱导的小鼠抑郁行为,具备抗抑郁活性,且其可通过调节 HPA 轴功能和缓解神经炎症等发挥活性。本试验为雌马酚神经功效的深入挖掘提供科学依据,并为神经调节类大豆功能性产品开发奠定理论基础。

## 参考文献

- [1] CHOI E J, KIM G H. The antioxidant activity of daidzein metabolites, odesmethylangetolensin and equol, in HepG2 cells [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 9(1): 328-332.
- [2] LEPHART E D. Equol's efficacy is greater than astaxanthin for antioxidants, extracellular matrix integrity & breakdown, growth factors and inflammatory biomarkers *via* human skin gene expression analysis[J]. *Functional Foods*, 2019, 59: 380-393.
- [3] LIN I C, YAMASHITA S, MURATA M, et al. Equol suppresses inflammatory response and bone erosion due to rheumatoid arthritis in mice[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2016, 32: 101-106.
- [4] LEGETTE L L, MARTIN B R, SHAHNAZARI M, et al. Supplemental dietary racemic equol has modest benefits to bone but has mild uterotrophic activity in ovariectomized rats [J]. *Nutrition*, 2009, 139(10): 1908-1913.
- [5] GALLUCCI A, PATEL D C, THAI K, et al. Gut metabolite Sequol ameliorates hyperexcitability in entorhinal cortex neurons following Theiler murine encephalomyelitis virus-induced acute seizures[J]. *Epilepsia*, 2021. DOI: 10.1111/EPI.16979
- [6] ISHIWATA N, MELBY M K, MIZUNO S, et al. New equol supplement for relieving menopausal symptoms: Randomized, placebo-controlled trial of Japanese women [J]. *Menopause*, 2009, 16(1): 141-148.
- [7] YU W, WANG Y, ZHOU D X, et al. Equol is neuroprotective during focal cerebral ischemia and reperfusion that involves p-Src and gp91phox [J]. *Current Neurovascular Research*, 2014, 11(4): 367-377.
- [8] LU C, GAO R J, ZHANG Y Y, et al. S-equol, a metabolite of dietary soy isoflavones, alleviates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice by inhibiting neuroinflammation and enhancing synaptic plasticity [J]. *Food & Function*, 2021, 12: 5770-5778.
- [9] MORENO-AGOSTINO D, WU Y T, DASKALOPOULOU C, et al. Global trends in the prevalence and incidence of depression: A systematic review and meta-analysis [J]. *Journal of Affective Disorders*, 2021, 281: 235-243.
- [10] JOHNSON E O, KAMILARIS T C, CHROUSOS G P, et al. Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis [J]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 1992, 16(2): 115-130.
- [11] WANG H X, JIANG N, LYU J, et al. Ginsenoside Rd reverses cognitive deficits by modulating BDNF-dependent CREB pathway in chronic restraint stress mice [J]. *Life Sciences*, 2020,

- 258; 118107.
- [12] LOPEZ J, BAGOT R C. Defining valid chronic stress models for depression with female rodents[J]. *Biological Psychiatry*, 2021, 90(4): 226-235.
- [13] WANG H X, LYU J W, JIANG N, et al. Ginsenoside Re protects against chronic restraint stress-induced cognitive deficits through regulation of NLRP3 and Nrf2 pathways in mice[J]. *Phytotherapy Research*, 2021, 35(5): 2523-2535.
- [14] YAN T X, MAO Q Q, ZHANG X Z, et al. Schisandra chinensis protects against dopaminergic neuronal oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis *via* the BDNF/Nrf2/NF- $\kappa$ B pathway in 6-OHDA-induced Parkinson's disease mice[J]. *Food & Function*, 2021, 12(9): 4079-4091.
- [15] 黄红, 陈碧清, 姜宁, 等. 鲜天麻对睡眠干扰诱导小鼠学习记忆障碍的改善作用[J]. *中草药*. 2020, 51(9): 2509-2516. (HUANG H, CHEN B Q, JIANG N, et al. Fresh *Gastrodia elata* ameliorates learning and memory impairments in sleep interruption induced mice [J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2020, 51(9): 2509-2516. )
- [16] ZHANG L M, QIU Z K, ZHAO N, et al. Anxiolytic-like effects of YL-IPA08, a potent ligand for the translocator protein (18 kDa) in animal models of post-traumatic stress disorder [J]. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2014, 17(10): 1659-1669.
- [17] TATYANA B, DAVID I M. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments [J]. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2009, 33(7): 1089-1098.
- [18] 李婧婷. 针刺对慢性束缚应激焦虑模型小鼠海马及 mPFC 中炎症因子表达的影响[D]. 北京:北京中医药大学, 2019. (LI J T. Effect of acupuncture on the expression of inflammatory factors in hippocampus and mPFC of chronic restraint stress anxiety model mice[D]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [19] CHEN J J, SHEN J X, YU Z H, et al. The antidepressant effects of resveratrol are accompanied by the attenuation of dendrite/dendritic spine loss and the upregulation of BDNF/p-cofilin1 levels in chronic restraint mice [J]. *Neurochemical Research*, 2021, 46(3): 660-674.
- [20] LIN S, LI Q, JIANG S, et al. Crocetin ameliorates chronic restraint stress-induced depression-like behaviors in mice by regulating MEK/ERK pathways and gut microbiota [J]. *Ethnopharmacology*, 2021, 268: 113608.
- [21] 夏忠源, 秦家骏, 陈先震. 间断束缚和单次束缚对抑郁小鼠模型建立的影响[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2021, 42(3): 299-305. (XIA Z Y, QIN J J, CHEN X Z. Comparison of intermittent restrain and constant restrain in establishing mice model of depression [J]. *Journal of Tongji University (Medical Science)*, 2021, 42(3): 299-305. )
- [22] ZHU Y L, WANG L Y, ZHAO D P, et al. Antidepressant-like effects of albiflorin involved the NO signaling pathway in rats model of chronic restraint stress [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2020, 18(11): 872-880.
- [23] SMITH K J, AU B, OLLIS L, et al. The association between creactive protein, interleukin-6 and depression among older adults in the community: A systematic review and meta-analysis [J]. *Experimental Gerontology*, 2018, 102: 109-132.
- [24] LEIGHTON S P, NERURKAR L, KRISHNADAS R, et al. Chemokines in depression in health and in inflammatory illness: A systematic review and meta-analysis [J]. *Molecular Psychiatry*, 2018, 23(1): 48-58.
- [25] ZHOU Y F, YAN M Z, PAN R L, et al. Radix polygalae extract exerts antidepressant effects in behavioral despair mice and chronic restraint stress-induced rats probably by promoting autophagy and inhibiting neuroinflammation [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 265(30): 113317.
- [26] CIARA B M, SOVIRA C, KALIRIS S R, et al. Chemotherapy-induced cognitive impairment is associated with increased inflammation and oxidative damage in the hippocampus [J]. *Molecular Neurobiology*, 2019, 56(10): 7159-7172.
- [27] ZHENG W, ZHANG Y, MA D, et al. ( $\pm$ ) Equol inhibits invasion in prostate cancer DU145 cells possibly via down-regulation of matrix metalloproteinase-9, matrix metalloproteinase-2 and urokinase-type plasminogen activator by antioxidant activity [J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2012, 51(1): 61-67.
- [28] HWANG K A, HWANG H J, HWANG Y J, et al. Mustard leaf extract suppresses psychological stress in chronic restraint stress-subjected mice by regulation of stress hormone, neurotransmitters, and apoptosis [J]. *Nutrients*, 2020, 12(12): 3640.
- [29] EOM T M, KWON H H, SHIN N, et al. Traditional Korean herbal formulae, *Yuk-Mi-Ji-Hwang-Tang*, ameliorates impairment of hippocampal memory ability by chronic restraint stress of mouse model [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 260: 113102.
- [30] LEE H J, LIM S M, KO D B, et al. Soyasapogenol B and genistein attenuate lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice by the modulation of NF- $\kappa$ B-Mediated BDNF expression [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(32): 6877-6885.