

牡蛎壳肉酶解物抗抑郁作用研究

张竺英¹ 俞鹏¹ 诸葛娟¹ 林嘉雄¹ 韦桂宁² 吴夏³ 通讯作者

(1.广西云康健健康管理有限公司 广西南宁 530000; 2.广西中医药研究院 广西南宁 530000; 3.广西壮族自治区药品监督管理局 广西南宁 530000)

摘要:目的:探讨牡蛎壳肉酶解物抗抑郁作用。方法:通过小鼠悬尾实验、小鼠强迫游泳实验、利血平诱导抑郁症大鼠模型,观察牡蛎壳肉酶解物抗抑郁作用。结果:牡蛎壳肉酶解物中剂量组可显著缩短小鼠的悬尾不动时间及游泳不动时间($P < 0.05$);牡蛎壳肉酶解物高剂量组眼睑下垂大鼠数量显著减少($P < 0.05$),高、低剂量组在圈内保留时间显著减少($P < 0.05$),高、中剂量组大鼠血清中5-HT、DA的水平明显升高($P < 0.05$),高、中剂量组大鼠血清中MAO、IL-6的水平明显降低($P < 0.05$)。结论:牡蛎壳肉酶解物具有一定的抗抑郁作用,其机制可能与其对神经递质的影响及抗炎作用有关。

关键词:牡蛎壳肉;酶解;抗抑郁

抑郁症是一种情感障碍性精神疾病,主要表现为情绪低落、思维迟缓以及运动抑制,常伴有睡眠障碍、消化功能减弱、躯体不适、自责自罪,严重的甚至出现自残、自杀观念及行为,具有两高一难的治疗特点(发病率高、复发率高、治愈难)^[1-2]。抑郁症的持续或反复发作不但使患者的生存质量下降,工作能力和范围受限,而且增加了家庭和社会的沉重负担。随着社会经济生活、生活节奏加快以及生活压力增加,抑郁症已成为现代社会危害全人类身心健康的常见病,其发病率逐年攀升。据世界卫生组织(WTO)最新统计分析,抑郁症是危害人类健康最严重的十大疾病之一,抑郁症的高发病率、致死率、致残率和疾病负担已引起社会的广泛重视^[3-5]。现阶段用于治疗抑郁症的药物主要包括:单胺氧化酶抑制剂、单胺氧化酶再摄取抑制剂、三环类抗抑郁剂、5-羟色胺再摄取抑制剂、5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取双重抑制剂等。但这些药物普遍存在起效慢、

有效率低、药物依赖和毒副作用大、易复发、不良反应多等缺点,而且由于起效慢,长期使用引起体重增加,性功能障碍等副作用,导致患者依从性差,不能坚持服药。因此,研发高效、低毒及副作用小的防治抑郁症的药物已成为国际关注的课题。

牡蛎(*ostrea gigas tnumb*)俗称海蛎子、蚝等,是世界上第一大养殖贝类。牡蛎肉嫩味鲜,药食兼用,在我国已有几百年的历史。近年来,酶制剂在海洋贝类资源加工过程中得到了普遍的应用,贝类蛋白酶解工艺及其酶解物功效的研究不断进展,酶解技术已经成为海洋贝类蛋白资源高值化、资源化、生态化开发利用的重要手段^[6-8]。但是,如何借鉴和突破传统酶解技术与工艺,对海洋贝类资源的绿色高值化开发,仍是我国贝类资源综合利用中一个重要的研究领域。牡蛎具有治虚弱、解丹毒、降血压、滋阴壮阳、止渴等药用价值。为了探讨牡蛎壳肉酶解物抗抑郁作用,我们通过小鼠悬尾实验、小鼠强迫游泳实验、利血平诱导抑郁症大鼠模型,观察牡蛎壳肉酶解物抗抑郁作用,以期研发高效低毒的抗抑郁药物提供实验依据。

1、实验材料

1.1 药品及试剂

牡蛎壳肉酶解物的制备(1)牡蛎壳肉分离洗净;(2)按重量比牡蛎肉:牡蛎壳为1:4~5的比例将牡蛎肉和牡蛎壳混合,然后置于90~95℃的水中余烫7~10min;用胶体磨将牡蛎肉和牡蛎壳研磨至200~500 μ m,得到研磨液;(3)在研磨液中加入蛋白酶、纤维素酶和葡糖酸内酯进行酶解;所述蛋白酶的规格为30000u/g~50000u/g,加入量为底物质量的0.5%~1.5%;纤维素酶的规格为10000u/g,加入量为底物质量的0.2%~0.6%;葡糖酸内酯酶的加入量为底物质量的0.1%~0.3%;酶解温度为40℃~42℃,酶解时间为2~4h;酶解之后升温至100℃保持15min灭酶;过滤去除不溶性成分,得到牡蛎壳肉酶解液;(4)将所述牡蛎壳肉酶解液通过膜,截留分子量范围在1000~2000道尔顿(8~15k);(5)然后将牡蛎壳肉酶解液浓缩至含固量为10%~20%,喷雾干燥,即得到牡蛎壳肉酶解物。利血平注射液,天津金耀氨基酸有限公司,

批号:2006041;盐酸氟西汀胶囊,礼来苏州制药有限公司,批号:9833A;5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)试剂盒, CusabioBiotechCO., LTD,批号:C0601800187。

1.2 动物 昆明种小鼠,8周龄,体质量18~22g,SPS级;Wistar大鼠,9周龄,体质量180~220g,SPS级,均由广西医科大学实验动物中心提供,动物质量合格证证号:SCXK桂2014-0002。动物观察室:温度25℃ \pm 1℃,相对湿度60% \pm 10%。

1.3 主要仪器 13960型iMark酶标仪(JapanBio-rad公司);TDL-5000B型低速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);FA1004电子天平(上海精科天平仪器厂)。

2、方法

2.1 牡蛎壳肉酶解物对小鼠悬尾的影响

雄性昆明小鼠,体重18~22g,每组10只。分别设置对照组,阳性组(氟西汀10mg \cdot kg⁻¹),牡蛎壳肉酶解物高、中、低剂量组(分别相当于含牡蛎鲜肉12、6、3g \cdot kg⁻¹);牡蛎肉酶解物高、中、低剂量组(分别相当于含牡蛎鲜肉12、6、3g \cdot kg⁻¹)。对照组给予等量的蒸馏水,各组均连续灌胃给药10d,末次给药1h后测试。将单个小鼠在距尾尖部约2cm处用医用胶布固定在悬尾箱(长30cm \times 宽30cm \times 高25cm)上部支架上,使其成倒挂状态,头部离箱底约5cm。悬挂6min,记录后4min内累计不动的时间(不动状态即小鼠停止挣扎不动或无任何活动)。

2.2 牡蛎壳肉酶解物对小鼠强迫游泳的影响

雄性昆明小鼠,体重18~22g,每组10只。分别设置对照组,阳性组(氟西汀10mg \cdot kg⁻¹),牡蛎壳肉酶解物高、中、低剂量组(分别相当于含牡蛎鲜肉12、6、3g \cdot kg⁻¹),牡蛎肉酶解物高、中、低剂量组(分别相当于含牡蛎鲜肉12、6、3g \cdot kg⁻¹)。对照组给予等量的蒸馏水,各组均连续灌胃给药10d,末次给药1h后测试。将小鼠单独放入缸内水深10cm的圆柱形玻璃缸中(高20cm、直径14cm),水温25℃ \pm 2℃,从小鼠进入水面后计时6min,记录后4min内游泳累计不动的时间(指小鼠在水中停止挣扎或显示漂浮状态,仅有微小的肢体运动以保持头部浮在水面)。

2.3 牡蛎壳肉酶解物对利血平引起的抑郁症大鼠的影响

雄性SD大鼠,体重180~220g,喂养适应1周后,按空腹体重随机分组,每组10只。分别设置对照组、模型组、阳性组、牡蛎壳肉酶解物高、中、低剂量组(分别相当于含牡蛎鲜肉12、6、3g \cdot kg⁻¹),牡蛎肉酶解物高、中、低剂量组(分别相当于含牡蛎鲜肉12、6、3g \cdot kg⁻¹)。对照组大鼠每天腹腔注射生理盐水0.5mL \cdot kg⁻¹,其余各组大鼠每天腹腔注射利血平0.5mg \cdot kg⁻¹造模,连续注射10天;自第一天开始造模后开始,注射完生理盐水或利血平后按照以下给药方式灌胃给药:阳性组给予氟西汀1.8mg \cdot kg⁻¹,牡蛎壳肉酶解物高剂量组给予相当于牡蛎12g \cdot kg⁻¹,牡蛎壳肉酶解物中剂量组给予相当于牡蛎6g \cdot kg⁻¹,对照组、模型组给予同等体积的蒸馏水,每天1次。

自造模后,每天观察各组大鼠行为学情况:记录各组大鼠上睑下垂、运动抑制等情况。上睑下垂观察时,将大鼠放在支架上,观

察大鼠眼睑不能睁开 1/2 的动物只数, 计算对抗率, 对抗率=(1-上睑下垂大鼠 / 组内动物总数) × 100%; 运动抑制观察时, 将动物放于直径 40cm 的圆形白板的中心位置观察 30s, 观察不同组中大鼠呆在圈内的时间。

末次给药后 1h, 于大鼠腹主动脉取血, 离心取血清, 检测血清中 5-HT、DA、MAO、IL-6 的水平, 观察牡蛎壳肉酶解物对利血平诱导大鼠抑郁症血清神经递质及炎症因子的影响。

3、结果

3.1 牡蛎壳肉酶解物对小鼠悬尾的影响

与对照组相比, 灌胃给予牡蛎壳肉酶解物 10d 后, 高、中、低剂量组均可显著缩短小鼠悬尾不动时间, 差异有统计学意义 (* P < 0.05)。和牡蛎肉酶解物中剂量组比较, 牡蛎壳肉酶解物中剂量组的悬尾不动时间显著降低, 比较有统计学意义 (P < 0.05)。结果见表 1。

表 1 牡蛎壳肉酶解物对小鼠悬尾不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别剂量	悬尾不动时间 (s)
对照组	- 102.50 ± 40.10
阳性对照组	10mg.kg ⁻¹ 54.90 ± 44.28*
牡蛎壳肉酶解物高剂量组	12g.kg ⁻¹ 60.30 ± 45.95*
牡蛎壳肉酶解物中剂量组	6g.kg ⁻¹ 63.10 ± 31.17*
牡蛎壳肉酶解物低剂量组	3g.kg ⁻¹ 68.90 ± 37.37
牡蛎肉酶解物高剂量组	12g.kg ⁻¹ 59.20 ± 45.04*
牡蛎肉酶解物中剂量组	6g.kg ⁻¹ 99.50 ± 43.23△
牡蛎肉酶解物低剂量组	3g.kg ⁻¹ 69.80 ± 44.95

注: 与对照组相比, *P<0.05, 与牡蛎肉酶解物相同剂量组比较: △P<0.05

3.2 牡蛎壳肉酶解物对小鼠强迫游泳的影响

与对照组相比, 灌胃给予牡蛎壳肉酶解物 10d 后, 高、中剂量组均可显著缩短小鼠游泳不动时间 (*P < 0.05)。和牡蛎肉酶解物中剂量组比较, 牡蛎壳肉酶解物中剂量组的游泳不动时间显著降低, 比较有统计学意义 (P < 0.05)。结果见表 2

表 2 牡蛎壳肉酶解物对小鼠强迫游泳的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量	游泳不动时间 (s)
对照组	-	129.40 ± 44.31
阳性对照组	10mg.kg ⁻¹	90.80 ± 30.00*
牡蛎壳肉酶解物高剂量组	12g.kg ⁻¹	81.90 ± 40.80*
牡蛎壳肉酶解物中剂量组	6g.kg ⁻¹	84.80 ± 36.78*
牡蛎壳肉酶解物低剂量组	3g.kg ⁻¹	96.60 ± 32.89
牡蛎肉酶解物高剂量组	12g.kg ⁻¹	85.50 ± 34.15*
牡蛎肉酶解物中剂量组	6g.kg ⁻¹	118.60 ± 32.57△
牡蛎肉酶解物低剂量组	3g.kg ⁻¹	99.20 ± 21.56

注: 与对照组相比, *P<0.05, 与牡蛎肉酶解物相同剂量组比较: △P<0.05

3.3 牡蛎壳肉酶解物对利血平引起的抑郁症大鼠的影响

表 3 牡蛎壳肉酶解物对大鼠血清中神经递质及炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量	5-HT 浓度	DA 浓度	MAO 浓度	IL-6 浓度
		Ng.mL ⁻¹	pg.mL ⁻¹	ng.mL ⁻¹	pg.mL ⁻¹
对照组	-	20.76 ± 2.36*	1400.64 ± 486.68*	376.53 ± 14.31*	60.03 ± 8.76*
模型组	-	17.66 ± 2.61	999.16 ± 126.08	402.85 ± 25.89	78.68 ± 14.12
氟西汀	1.8mg.kg ⁻¹	20.32 ± 2.77*	1375.79 ± 430.94*	377.98 ± 19.84*	62.36 ± 15.11*
牡蛎壳肉酶解物高剂量组	12g.kg ⁻¹	19.81 ± 1.83*	1347.60 ± 368.41*	380.78 ± 19.48*	63.3 ± 16.29*
牡蛎壳肉酶解物中剂量组	6g.kg ⁻¹	20.34 ± 2.00*	1227.08 ± 279.81*	379.32 ± 22.75*	66.75 ± 10.68*
牡蛎壳肉酶解物低剂量组	3g.kg ⁻¹	19.54 ± 1.95	1111.18 ± 251.60	381.81 ± 24.75	66.87 ± 11.47
牡蛎肉酶解物高剂量组	12g.kg ⁻¹	20.45 ± 2.02*	1235.04 ± 241.03*	369.28 ± 20.94*	64.38 ± 14.78*
牡蛎肉酶解物中剂量组	6g.kg ⁻¹	17.44 ± 2.27△	991.28 ± 207.24△	383.20 ± 17.81	67.73 ± 12.06
牡蛎肉酶解物低剂量组	3g.kg ⁻¹	19.43 ± 1.63	1106.95 ± 202.21	382.09 ± 20.57	69.44 ± 11.08

3.3.1 牡蛎壳肉酶解物对利血平诱导的抑郁症大鼠行为学的影响

造模后第 4 天, 对照组大鼠没有眼睑下垂现象; 模型组有 9 只大鼠出现眼睑下垂, 与对照组相比其对抗率差异有统计学意义 (#P < 0.01); 牡蛎壳肉酶解物高剂量组出现 3 只大鼠眼睑下垂、低剂量组出现 6 只大鼠眼睑下垂, 与模型组相比其对抗率均有所升高。如表 4 所示, 造模后第 4 天, 与对照组相比, 模型组大鼠在圈内保留时间显著增加 (*P < 0.05); 与模型组相比, 牡蛎壳肉酶解物高、低剂量组在圈内保留时间显著减少 (*P < 0.05)。结果见表 3、4。

表 3 牡蛎壳肉酶解物对大鼠眼睑下垂的影响 ($\bar{x} \pm s$ n=10)

组别剂量	眼睑下垂大鼠数量 (只)
对照组	- 0
模型组	- 9
氟西汀	1.8mg.kg ⁻¹ 3
牡蛎壳肉酶解物高剂量组	12g.kg ⁻¹ 3
牡蛎壳肉酶解物中剂量组	6g.kg ⁻¹ 4
牡蛎壳肉酶解物低剂量组	3g.kg ⁻¹ 6
牡蛎肉酶解物高剂量组	12g.kg ⁻¹ 4
牡蛎肉酶解物中剂量组	6g.kg ⁻¹ 6
牡蛎肉酶解物低剂量组	3g.kg ⁻¹ 7

表 4 牡蛎壳肉酶解物对大鼠运动抑制的影响 ($\bar{x} \pm s$ n=10)

组别剂量	圈内保留时间 (s)
对照组	- 6.40 ± 1.84*
模型组	- 29.80 ± 0.63
氟西汀	1.8mg.kg ⁻¹ 24.80 ± 5.69*
牡蛎壳肉酶解物高剂量组	12g.kg ⁻¹ 26.60 ± 3.66*
牡蛎壳肉酶解物中剂量组	6g.kg ⁻¹ 26.00 ± 4.55*
牡蛎壳肉酶解物低剂量组	3g.kg ⁻¹ 27.40 ± 3.89
牡蛎肉酶解物低高量组	12g.kg ⁻¹ 26.90 ± 3.03*
牡蛎肉酶解物低中量组	6g.kg ⁻¹ 26.80 ± 4.83
牡蛎肉酶解物低剂量组	3g.kg ⁻¹ 27.20 ± 3.94

注: 与模型组相比, *P<0.05

3.3.2 牡蛎壳肉酶解物对利血平诱导的抑郁症大鼠血清神经递质及炎症因子的影响

与对照组相比, 模型组大鼠血清中 5-HT、DA 的水平明显降低 (*P < 0.05)。与模型组相比, 牡蛎壳肉酶解物高、中剂量组大鼠血清中 5-HT 的水平明显升高 (*P < 0.05); 牡蛎壳肉酶解物高、中剂量组大鼠血清中 DA 的水平明显升高 (*P < 0.05), 低剂量组没有显著性差异。与对照组相比, 模型组大鼠血清中 MAO、IL-6 的水平明显升高 (#P < 0.05)。与模型组相比, 牡蛎壳肉酶解物高、中剂量组大鼠血清中 MAO、IL-6 的水平明显降低 (*P < 0.05)。和牡蛎肉酶解物中剂量组比较, 牡蛎壳肉酶解物中剂量组的血清 5-HT、DA 显著增高, 比较有统计学意义 (P < 0.05)。如图 5

注：与模型组相比，* $P < 0.05$ ，和牡蛎肉酶解物中剂量组比较， $\Delta < 0.05$ 。

4、讨论

抑郁症病因复杂，目前还未完全阐明，其中，遗传因素、儿茶酚胺假说、心理-社会因素在一定程度上解释抑郁症的发病机制。遗传因素：大样本人群遗传流行病学调查显示，与患病者血缘关系愈近，患病概率越高。一级亲属患病的概率远高于其他亲属，这与遗传疾病的一般规律相符。儿茶酚胺假说：主要指抑郁症的发生可能与大脑突触间隙神经递质 5-羟色胺(5-HT)和去甲肾上腺素(NE)的浓度下降有关；由于很多抗抑郁剂，如选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)或者选择性 5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI)等使用后，虽然大脑突触间隙这些神经递质的浓度很快升高，但抗抑郁的效果一般还是需要 2 周左右才会起效，因此才有了 5-HT 和 NE 受体敏感性增高(超敏)的假说。心理-社会因素：各种重大生活事件突然发生，或长期持续存在会引起强烈或者(和)持久的不愉快的情感体验，导致抑郁症的产生。迄今为止，抑郁症病因与发病机制还不明确，也无明显的体征和实验室指标异常，概括的说是生物、心理、社会(文化)因素相互作用的结果。

牡蛎肉含有丰富的糖原、蛋白质、氨基酸、牛磺酸、脂肪酸、维生素和无机盐。氨基酸含有缬氨酸，苏氨酸，亮氨酸，谷氨酸，半胱氨酸，甘氨酸等 10 种必须氨基酸；具有多种生理功能的牛磺酸含量高达 3.332%。糖类化合物主要有葡萄糖、阿拉伯糖、岩藻糖等多种单糖；维生素有 A1, B1, B2, B6, B12, D, E 等；无机盐有铁，铜，锌，锰，钙，磷，碘等。牡蛎经蛋白酶解后，酶解液中含小分子活性肽、低分子量多糖、牛磺酸以及多种活性微量元素等，具有良好的药理活性^[9-13]。

我们的研究表明，牡蛎壳肉酶解物中剂量组可显著缩短小鼠的悬尾不动时间及游泳不动时间，显著减少可显著减少利血平诱导的抑郁模型大鼠眼下垂、减少圈内保留时间，显著升高抑郁症大鼠血清中 5-HT、DA，降低抑郁症大鼠血清中 MAO、IL-6 的水平明显具有一定的抗抑郁作用。牡蛎配予不同中药对抑郁具有显著的治疗作用，经过酶解以后，牡蛎壳肉酶解物表现出显著的抗抑郁作用，其物质基础及分子机制，有待进一步研究。

参考文献：

[1] Monroe SM, Harkness KL. Major Depression and Its Recurrences: Life Course Matters. *Annu Rev Clin Psychol*, 2022, 18:329-357.

[2] Dehn LB, Beblo T. Verstimmt, verzerrt, vergesslich: Das Zusammenwirken emotionaler und kognitiver Dysfunktionen bei Depression [Depressed, biased, forgetful: The interaction of emotional and cognitive dysfunctions in depression]. *Neuropsychiatr*, 2019, 33(3):123-130.

[3] 于大君,李真,张玉.大学生焦虑抑郁现状及社会因素分析[J].心理月刊,2022,17(01):31-33+42.

[4] 苏丽琼,钟博文,翟林湘等.5-HTTLPR 基因、人格特征和职业紧张与抑郁症状关系的流行病学调查[J].慢性病学杂志,2021,22(11):1642-1645.

[5] Arrarús JI, Manrique E. La percepción de la depresión y de su tratamiento [How depression and its treatment are perceived]. *An Sist Sanit Navar*, 2019, 42(1):5-8.

[6] 邓宇,曹文红,陈忠琴等.白贝肉酶解工艺的优化及其产物呈味特性研究[J].中国调味品,2023,48(03):11-17.

[7] 王梦娟,王灵昭,顾涵等.南极磷虾自溶物深度酶解产物鲜味研究[J].中国调味品,2023,48(01):75-79.

[8] 李苏,陈昌威,付靖雯等.条浒苔多糖酶解物制备工艺优化及体外降血脂活性研究[J].江苏海洋大学学报(自然科学版),2022,31(04):18-27.

[9] 代春美,廖晓宇,叶祖光.海洋中药牡蛎的化学成分、药理活性及开发应用[J].天然产物研究与开发,2016,28(03): 471-474+437.

[10] 罗艳,黄权新,蔡捷.牡蛎酶解产物的种类、生物活性及应用研究进展[J].中国食物与营养,2022, 28(11):49-53.

[11] 杨元英.牡蛎多肽的提取工艺及抗氧化活性研究[J].中国调味品,2023,48(01):18-21.

[12] 李晋祯,郑惠娜,任鼎鼎等.牡蛎低分子肽 LOPs 对短期免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J].中国食品学报,2022,22(10):143-152.

[13] 王小艳,王庆苗,周怀霞.牡蛎酶解液对 2 型糖尿病小鼠皮肤软组织创伤愈合修复的作用及其机制研究[J].中国现代医学杂志,2022,32(10):24-29.

作者简介：张竺英，女，广西人，工程师。工作单位：广西云康健健康管理有限公司，研究方向：食品科学与工程