

深海鲣鱼(*Katsuwonus pelamis*)眼窝油中 DHA 和 EPA 的提取及其抗抑郁活性研究*

李海波¹ 吕倩倩² 白冬² 王欢² 关丽萍² 谢超²

(1. 浙江国际海运职业技术学院 舟山 316021; 2. 浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室 浙江海洋大学 食品与医药学院 舟山 316022)

摘要 为了探索鲣鱼(*Katsuwonus pelamis*)鱼头眼窝肉中的 DHA(C_{22:6}n₃)和 EPA(C_{20:5}n₃)的抗抑郁活性效果,采用现代食品分离技术分离提取鲣鱼眼窝肉中的 DHA 和 EPA,并对其抗抑郁活性效果进行研究。研究结果发现,当 DHA 和 EPA 剂量分别为 50, 100 和 300mg/kg 时,能够对强迫游泳实验和悬尾实验的小鼠产生抗抑郁作用,其中低剂量(50mg/kg)表现为最活跃。DHA 和 EPA 还能够对引起头抽动综合征的 5-羟色胺小鼠产生轻微的增强作用。通过高效液相色谱-电化学法同时测定小鼠大脑区域内主要的单胺类神经递质及其代谢产物。本实验发现,与用压力媒介物处理的小鼠相比, DHA 和 EPA 能够显著增加主要神经递质 5-羟色胺和去肾上腺素在小鼠海马体、下丘脑及皮质层中的浓度,并减少 5-羟色胺的代谢。DHA 和 EPA 能够在预测抗抑郁特性的动物模型中(强迫游泳实验,悬尾实验)明确其具有抗抑郁活性效果,具有潜在的生物医学应用前景和环保效应。

关键词 鲣鱼; DHA; EPA; 抗抑郁活性; 5-羟色胺; 神经递质

中图分类号 TS254, R964 **doi:** 10.11693/hyhz20160600141

抑郁症是主要的精神疾病之一,它通常伴随着某些相关的症状,如:定期的消极情绪,减少体力活动,产生无助感以及思想和认知功能的迟钝表现。在 2000 年,它被世界卫生组织列为第四大造成全球疾病负担的主要原因,并且可能到 2020 年将成为第二大引发相关疾病障碍的原因(Lopez *et al*, 1998; Tian, 2010)。当前大约已有三分之二的抑郁症患者采取了相关的治疗措施,但其体系完善的幅度仍旧很小。并且,即便是目前已经开发了许多有疗效的抗抑郁药,但是仍然有大约三分之一的受试者认为当前的医疗设备不够完善,其治疗结果也不尽如人意(Thase, 2003)。

二十二碳六烯酸(DHA, C_{22:6}n₃)和二十碳五烯酸(EPA, C_{20:5}n₃)都是长链多不饱和脂肪酸(PUFA),也被称为 ω-3 脂肪酸,具有降低胆固醇、预防心血管疾病

的功能。在过去的十年里, EPA 和 DHA 已经被普遍认为是能够对人类健康和发展产生有益作用的有效膳食成分(Siriwardhana *et al*, 2012)。其在大脑和视网膜组织结构中也具有重要作用(Bradbury, 2011)。并且有越来越多的证据表明, ω-3 多不饱和脂肪酸可以有效治疗各种精神障碍,尤其是单极重度抑郁症(MDD)。例如, Mischoulon 等(2008)研究了 DHA 的抗抑郁功效和剂量-响应模式,其试验结果显示,较低剂量的 DHA 就可能对抑郁症产生良好的治疗效果。Mozaffari-Khosravi 等(2013)进行了一项运用单中心、随机、双盲、对照等方法的平行试验组,比较了 EPA 与 DHA 分别作为试剂对于依靠药物来维持治疗的轻度到中度抑郁症患者的疗效程度。其结果表明, EPA 作为抗抑郁药物的佐剂来治疗轻度到中度的抑郁症患者可能比 DHA 或安慰剂更有效。

* 浙江省科技计划项目, 2016C32080 号; 舟山市科技计划项目, 2014C41002 号, 2016C41003 号。李海波, 副教授, E-mail: scklhb@163.com

通讯作者: 谢超, 副教授, E-mail: xc750205@163.com

收稿日期: 2016-06-30, 收修改稿日期: 2016-07-27

深海鲣鱼(*Katsuwonus pelamis*)是一类典型的身长 60—250cm, 体重为 400 磅左右的金枪鱼, 生存于太平洋、大西洋和印度洋的亚热带水域中(Farley *et al.*, 2006)。在食品企业里, 鲣鱼通常被加工成为罐装食品或生鱼片, 而其下脚料则被认为是废弃物而丢弃。因此, 近几年鲣鱼废弃物已经对我国环境造成了严重的威胁。通过提取废料鲣鱼头中的 DHA 和 EPA, 能够有效减少对环境的污染。本实验的目的是研究从鲣鱼眼窝油中提取的 DHA 和 EPA 对小鼠的几个中枢神经系统的影响, 再运用动物抑郁模型, 例如强迫游泳实验(Forced swimming test, FST)和悬尾实验(Tail suspension test, TST)来评估它们的抗抑郁活性效果。

1 材料与方法

1.1 鲣鱼眼窝肉的准备

鲣鱼头用 40—45°C 的热水浸泡两天以除去鱼骨和鱼皮。并将洗涤后的头部眼窝肉擦干净, 放置于 -20°C 的冰箱内冷藏。

1.2 碱水解法

水解胶原蛋白和其它有机部分。碱水解法的方法如下: 首先, 将 100g 擦干净的鲣鱼眼窝肉放置于三颈烧瓶中, 并加入 1.5 倍于原料的水。再将混合物在 50°C 的条件下搅拌均匀, 并用 40% 的氢氧化钾将 pH 调至 8.0。接着将温度升高到 80°C, 并持续搅拌 50min。然后再在该混合物中加入 5% 的氢氧化钾进行水解, 并盐析 15min。最后在 6000r/min 在条件下离心 5min, 此时分离出来的油相即为鱼油(Barakat *et al.*, 2009)。

1.3 脂肪酸甲酯的制备

脂肪酸甲酯的制取首先需要加入 200 μ L 的乙酰氯并在 75°C 的温度下恒温 1h。接着, 将反应物用 4mL, 7% 的 K_2CO_3 进行中和, 并用 2mL 的己烷来萃取。然后在 2500r/min 条件下进行 20min 离心分离。此时 1.6mL 的己烷层能够在氮气下干燥, 并再次溶解于 280 μ L 的庚烷内并注射进入气相色谱仪(GC)。

1.4 脂肪酸甲酯的气相色谱(GC)

将 1 μ L 试样注入 SHIMADZU-PLUS-GC 系统。进样器的温度为 250°C, 随后脂肪酸甲酯在 30m 的聚乙二醇气相毛细管柱上被分离。柱的初始温度为 160°C, 保持 5min; 然后以 5°C/min 的速度缓慢升温并最终达到 230°C。气相色谱仪利用萃取的方法能定量测定 DHA 和 EPA 的值。通过与真实的标准保留时间比较, 脂肪酸(DHA 和 EPA)就可被鉴定出来。纯的

DHA 和 EPA 的甲酯可被用作标准来分析他们的相对含量。标准溶液的浓度通过蒽酮法测定(注射 2 μ L 标准溶液于气相色谱仪内, 获得标准曲线, 并分析出它的峰值)。

1.5 给药

对不同组的健康小鼠进行药物治疗, 并对每一个进行测试。将氟西汀溶解于生理盐水中。并且所有剂量均表示为每 kg 体重所对应的药物的 mg 数。食物, 不包括水, 在给动物喂药的前一个小时内不能摄入。将药品以 DHA 或 EPA(50, 100 和 300mg/kg), 氟西汀(10mg/kg), 盐水(15mg/kg)的配比, 连续 21 天每天 1 次的方式给小鼠(每组有 10 只)口服喂药且进行相关的强迫游泳实验和悬尾实验。并在最后一次的药物治疗后进行 1h 的行为测试。

1.6 强迫游泳实验(FST)

在强迫游泳实验中, 采用本地品种的雄性 Balb/e 小鼠(18—22g)(Porsolt, 1981)。将其安置在六个组。在试验当天, 将小鼠逐个在扔进一个装有 10cm 高的水, 水温为(22 \pm 3)°C 的有机玻璃圆筒内(高 25cm, 直径 10cm), 使它们在水里待上 6min。所有游泳测试的过程都会被圆筒上方直接固定的摄像机所记录。在实验过程期间也还会有两个主要的观察员, 但观察员对每个小鼠的治疗和录像带的得分情况都毫不知晓。在游泳训练结束后, 将小鼠用毛巾擦干, 并带回它们原来的处所。小鼠在这个实验中仅被测验一次。且所有的强迫游泳实验都是在上午 12 点到下午 6 点这个时间段内进行。

1.7 悬尾实验(TST)

用夹子(长度为 2cm)夹住小鼠尾巴并将其单独悬挂在一个箱子内(25cm \times 25cm \times 30cm), 使其头部到箱子的底部约为 5cm。测试在一个黑暗的房间内, 在最小的背景噪音下进行。每只小鼠都悬挂 6min, 并观察其静止不动的时间且在最后的 4min 内进行间断测试衡量。所有的测试过程都会被箱子上方直接固定的摄像机所记录。在实验过程期间也会有两个主要的观察员, 但是他们对每个小鼠的治疗和录像带得分情况都毫不知晓。只有当小鼠是被被动悬挂, 或者完全不动的情况下才认为它们是静止不动的。小鼠在这个实验中仅被测验一次。且所有的强迫游泳实验都是在上午 11 点到下午 3 点这段时间内进行的(Steru *et al.*, 1985)。

1.8 对 5-羟色胺引起小鼠头抽动综合征的增强作用在药物测试过程中, 进行腹腔注射 75mg/kg 的 5-

羟色胺之前应先口服测试药物 60min。然后将小鼠放入玻璃钟罩内, 14min 后 5 次计数相邻间隔 2min 的头部抽动小鼠的数量(包括第 14 和 16min, 24 和 26min, 34 和 36min, 44 和 46min, 54 和 56min)。在这些间隔的时间内小鼠也同时被观察是否存在全身性震颤, 前蹄踩踏或伸展姿势将腹部放置于接近笼子表面的情况。并计算每个小鼠的得分情况(最大的得分情况=25, 包括头抽动症状的存在与否)(Corne *et al*, 1963; Sánchez-Mateo *et al*, 2009)。

1.9 旷场试验

旷场试验用于评估动物的探究性活动(Elliott *et al*, 1986)。在实验之前, 所研究的 DHA 和 EPA 应先对小鼠给药 60min。这项研究是在 Archer 的方法上稍作修改对小鼠进行试验的(Archer, 1973)。旷场装置是一个非透明的塑料容器(80cm×60cm×30cm), 其底部被分成了 48 个尺寸为 10cm×10cm 的单元, 且之间没有围墙。这些动物被轻轻地放在了平台的中心, 被允许去探索周围的环境。在 5min 之内, 手动计数该小鼠的水平(横向移动)和竖直得分(后肢站立次数)情况。并且, 观察人员也不知道哪个组的小鼠已经被治疗过, 以及它们在旷场装置内的得分情况。该实验在黑暗的房间内进行, 其光照由装置在中心 1m 以上的 60 瓦电灯泡提供, 能够投射出淡黄色的光。

1.10 高效液相色谱(HPLC)的条件与测定

将小鼠断头处置, 迅速将其大脑取出, 放置于冰冷的玻璃板上解剖, 随后分离得到前额叶丘脑, 大脑皮层和海马体。将组织称重, 并放入于 0.1mol/L 磷酸二氢钠水溶液中(包括 0.85mmol/L OSA, 0.5mmol/L EDTA·NA₂)进行超声处理, 随后离心(12000r/min, 30min)。然后, 通过高效液相色谱-电化学法分析 5-羟色胺和去肾上腺素。高效液相色谱系统包括一个微孔反相柱(Shimadzu LC-10ATVP 高效液相系统, Shimadzu L-ECD-6A 电化学检测器, N2000 高效液相操作软件, Hypersil ODS C₁₈ 色谱柱 4.6×150mm 5μm)(Thermo, USA)。流动相为 0.1mol/L 的磷酸二氢钠水溶液(包括 0.8mmol/L OSA, 0.5mmol/L EDTA·NA₂)和 11%的甲醇, 并用磷酸调至 pH=3.4, 并经 0.45μm 滤膜过滤。通过被量化的 5-羟色胺和去肾上腺素来绘制标准工作曲线, 随后再对每一个样品计算其曲线下面积(AUC)。进样量通常为 20μL。且本实验每个样本的检出限为 20pg/g。

1.11 统计分析

数据采用单向方差分析(ANOVA)并结合

Newman-Keuls 检验和 Turkey 检验的方法来进行分析的(Tallarida *et al*, 1987)。0.05 及以下的概率水平可被广泛接受。卡方检验被用于检测由丁苯诱导的运动活性的百分比。由丁苯那嗪引起的眼睑下垂, 和由 5-羟色胺诱导的综合征可运用 Mann-Whitney 检验中的非参数数据来进行分析。

2 结果与分析

2.1 DHA 和 EPA 甲酯的纯化和结构鉴定

利用气相色谱仪分析鲑鱼眼窝油中提取的 DHA 和 EPA(图 1)。在样品制备过程之前应先将标准化的 DHA 和 EPA 甲酯注入气相色谱系统内。这两种鱼油在气象色谱频谱内产生的两个主峰分别在洗脱的第 15.779min 和第 21.298min(图 1C), 这与图 1A 和图 1B 在第 15.779min (EPA 甲酯)和第 21.298min 产生(DHA 甲酯)的峰相同。由此, 样品溶液中的 DHA 甲酯和 EPA 甲酯可以对应标准溶液的峰的保留时间来计算、分析出样品中 DHA 和 EPA 的含量, 并可证明鲑鱼眼窝油中确实含有 DHA 和 EPA。

2.2 在强迫游泳实验中 DHA 和 EPA 对不动时间的影响

当 DHA 和 EPA 的剂量为 50mg/kg ($P<0.001$)时, 能明显地发现小鼠通过对该剂量的依赖使不动状态的时间减少到 $108.1\pm 10.7s$ 。然而, 当 DHA 和 EPA 的剂量分别为 100 和 300mg/kg ($P<0.001$)时, 其不动状态时间只减少到 $127.7\pm 17.9s$ 和 $124.4\pm 15.3s$ 。空白对照小鼠的不动状态时间为 $157.0\pm 16.1s$ 。因此, 可以得出这三种情况对小鼠不动状态的抑制作用分别为 31.15%、18.66%和 20.76%。其结果见图 2。

2.3 在悬尾实验中 DHA 和 EPA 对不动时间的影响

相比较空白对照小鼠的不动状态时间为 $127.88\pm 15.68s$, 当 DHA 和 EPA 的剂量分别为 100mg/kg 和 300mg/kg ($P<0.001$)时, 能发现小鼠通过对该剂量的依赖使不动状态的时间减少到 $89.6\pm 9.1s$ 和 $93.5\pm 7.7s$ 。然而, 当 DHA 和 EPA 的剂量为 50mg/kg 时, 可使小鼠的不动状态时间发生更大幅度的改变, 减少到 $70.1\pm 4.8s$ ($P<0.001$)。因此, 可得出其抑制作用分别为 29.93%、26.88%和 45.18%。结果见图 3。

2.4 在旷场试验中 DHA 和 EPA 对不动时间的影响

表 1 展示了旷场试验的实验结果。本次试验研究表明, 作者用 DHA 和 EPA(剂量分别为 50, 100 和 300mg/kg)治疗的小鼠与空白对照组的小鼠在 5min 的旷场试验中表现的无明显区别。在强迫游泳实验中

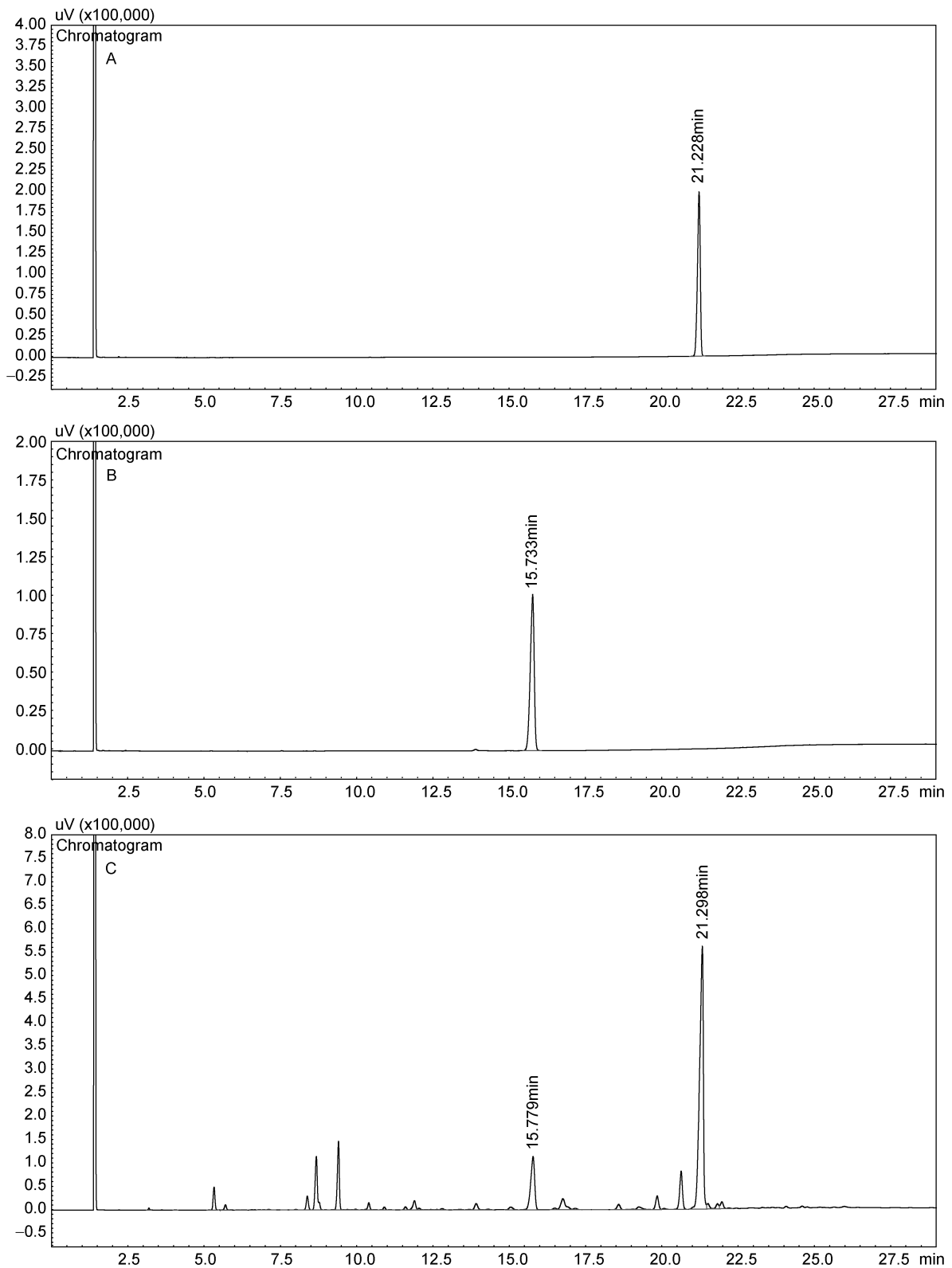


图 1 脂肪酸气相色谱图

Fig.1 Gas-chromatogram of fatty acid standard substances and the samples

注: A. 标准的 EPA 甲酯色谱图; B. 标准的 DHA 甲酯色谱图; C. 从鳕鱼头眼窝肉中提取的 DHA 和 EPA 样品色谱图

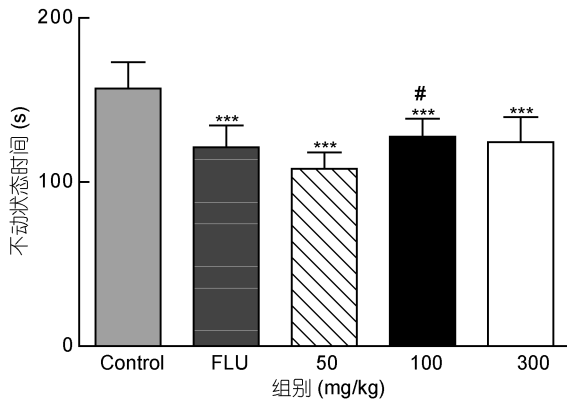


图2 在强迫游泳实验中, 给小鼠口服 DHA 和 EPA 后测定的不动状态时间

Fig.2 Immobility time of DHA and EPA in the FST after oral administration in mice

注: 数据为均值±均数标准误差(n=10)。统计分析根据 Turkey 实验的单向方差分析测得。***P<0.001 vs. control, #P<0.05 vs. DHA and EPA (50mg/kg)

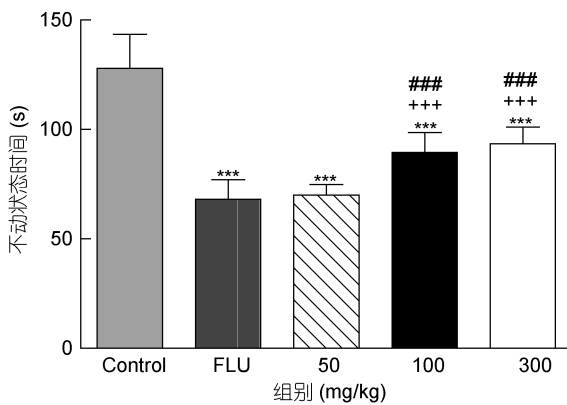


图3 在悬尾实验中, 给小鼠口服 DHA 和 EPA 后测定的不动状态时间

Fig.3 Immobility time of DHA and EPA in the TST after oral administration in mice

注: 数据为均值±均数标准误差(n=10)。统计分析根据 Turkey 实验的单向方差分析测得。***P<0.001; +++ P<0.001 vs. FLU; ### P<0.001 vs. DHA and EPA (50mg/kg)

表1 DHA 和 EPA 对小鼠 5min 旷场试验的结果数据记录

Tab.1 Effects of DHA and EPA on parameters recorded in 5min in open field test

处理组别	剂量(mg/kg)	横向移动	竖立
DHA/EPA	50	129.1±9.12	60.1±10.9
DHA/EPA	100	125.9±9.28	49.8±7.92
DHA/EPA	300	128.5±8.28	58.3±6.28
FLU	10	126.3±6.98	55.9±5.90
对照	—	127.4±7.42	56.2±6.21

注: 数据为均值±均数标准误差(n=10)。统计分析根据 Turkey 实验的单向方差分析测得

给小鼠口服氯丙咪嗪也不能使它们在旷场试验内显著地改变横向移动及竖立的次数。

2.5 DHA 和 EPA 对于 5-羟色胺治疗头抽动综合征的影响

表 2 展示了 DHA 和 EPA 对 5-羟色胺引起的小鼠头抽动综合征的结果。可以明显观察到 DHA 和 EPA (50mg/kg)对药物引起的综合征表现出微弱但却重要的作用(P<0.05, Mann-Whitney test)。而且, 尽管没有明确的统计学意义, 仍能得出它们能对 5-羟色胺引起头抽动综合征有显著效果。然而在任何一种情况下, 它所展示出的增强效应却都比氟西汀(一种抗抑郁药, 能选择性或优先地抑制 5-羟色胺酸的摄入)要弱(P<0.01)。

表2 DHA 和 EPA 对 5-羟色胺(75mg/kg i.p.)对于小鼠行为的影响

Tab.2 Effect of DHA and EPA on 5-HT (75mg/kg i.p.) behavior in mice

处理组	剂量(mg/kg, p.o.)	小鼠头抽动数	综合征评分 ^a
DHA/EPA	50	2.51±0.4	1.62±0.29 ^b
FLU	100	25.5±2.40*	24.72±0.13 ^c
对照	—	0.65±0.21	0.59±0.28

注: 数据为均值±均数标准误差(n=10)。*P<0.05 (Newman-Keuls test), ^bP<0.05 (Mann-Whitney test); ^cP<0.01 (Mann-Whitney test)

2.6 对小鼠大脑中单胺神经递质浓度的影响

用高效液相色谱-电化学法同时测定小鼠大脑区域内主要的单胺神经递质及其代谢物。其结果展示在表 3。DHA 和 EPA 的剂量为 50mg/kg, 氟西汀为

表3 在强迫游泳实验中, DHA 和 EPA 对小鼠大脑单胺神经递质的影响

Tab.3 Effects of FST exposure and DHA and EPA treatment on monoamine neurotransmitter concentrations in mouse brain

部位	组别	5-HT	NE
下丘脑	压力对照	412.5±11.3 ^z	247.7±10.5 ^z
	DHA and EPA	655.2±35.5 ^a	402.7±14.6 ^{b,z}
	氟西汀	643.2±58.4 ^a	385.3±53.6 ^b
海马体	整体对照	965.4±102 ^c	604.4±69.4 ^c
	压力对照	386.4±14.8 ^y	97.5±9.3 ^z
	DHA and EPA	403.5±11.6 ^z	263.8±13.7 ^z
皮质层	氟西汀	446.6±12.6 ^{b,z}	248.1±9.6 ^{b,z}
	整体对照	703.2±47.9 ^b	309.4±18.4 ^c
	压力对照	318.4±36.3 ^z	235.5±13.1 ^z
	DHA and EPA	549.7±24.8 ^a	286.4±10.8 ^a
	氟西汀	607.8±36.7 ^{a,z}	291.1±9.4 ^b
	整体对照	786.9±78.8 ^a	316.4±29.5 ^c

注: DHA 和 EPA 剂量均为(50 mg/kg), 氟西汀剂量为 5mg/kg。数据为均值±均数标准误差(n=10)。统计分析根据 Turkey 实验的单向方差分析测得。^aP<0.001, ^bP<0.01, ^cP<0.05 vs. 压力对照, ^zP<0.001, ^yP<0.01, ^xP<0.05 vs. 整体对照

5mg/kg。可以明显观察到,在强迫游泳实验中,DHA 和 EPA 及 FLU 能够显著增加主要神经递质 5-羟色胺和去甲肾上腺素在小鼠海马体、下丘脑及皮质层中的浓度。

3 讨论

在本次试验中,作者利用碱水解法来提取深海鲑鱼眼窝肉中的 DHA 和 EPA,并采用强迫游泳实验和悬尾实验来验证它们的抗抑郁活性。在这两种实验中,当 DHA 和 EPA 的剂量分别为 50, 100 和 300mg/kg 时都能减少小鼠不动状态的时间,显示其抗抑郁活性。此外,DHA 和 EPA (50mg/kg, p.o.)还能增强 5-羟色胺诱导的头抽动应答,说明他们能参与到中枢血清素激活系统内。

强迫游泳实验(Porsolt *et al*, 1977)和悬尾实验(Willner, 1984)都是一种表现行为绝望的模型,这与人类的抑郁症十分相似。这项测试是基于对动物的观察,从最开始的逃离表现,到后来发现无处可逃后的绝望,从而使其产生了静止不动的消极状态。这种不动的状态可能是反映了对于坚持直接逃跑的绝望,也可能是一种被动行为的发展,使动物想要在紧张刺激的应对活性形式中脱离。通过这两种实验,可以发现使用 DHA 和 EPA 治疗过的小鼠它们在直接逃跑行为过程中会使不动状态时间降到最低,而这可能是由于它们内源性的抑郁症减弱的效果。而且,不同剂量处理的 DHA 和 EPA(50, 100 和 300mg/kg)对抑制不动状态的效果也有显著差异。低剂量(50mg/kg)展现出了较好的活性,而高剂量(100mg/kg 和 300mg/kg)的抗抑郁活性则相对较弱。

旷场试验是用来评估 DHA 和 EPA 对自发运动活性的影响的。这是一个经典的用于评估药物和一般动物活性的自主效应实验(Galdino *et al*, 2009)。该研究结果表明了 DHA 和 EPA 并没有显著改变小鼠的运动活性(横向移动和竖立)。因此可以说明,在强迫游泳实验中所观察到的效果也是不可能由一般的运动活性的刺激而产生的。此外,作者还发现 DHA 和 EPA 都能对由 5-羟色胺诱导的头抽动综合征产生轻微的增强作用,这可能是由于它们中的一部分抗氧化活性参与到了血清素机制里。

综上,本次研究提供的证据表明从鲑鱼眼窝油中提取的 DHA 和 EPA 能够在预测抗抑郁特性的动物模型中(强迫游泳实验,悬尾实验)明确表明其具有抗抑郁活性效果。这不仅使得 DHA 和 EPA 增加了潜在

的生物医学应用前景,而且还减少了对环境污染,促进了下脚料的开发利用。

参 考 文 献

- Archer J, 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav*, 21(2): 205—235
- Barakat N A M, Khil M S, Omran A M *et al*, 2009. Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods. *J Mater Process Technol*, 209(7): 3408—3415
- Bradbury J, 2011. Docosahexaenoic acid (DHA): an ancient nutrient for the modern human brain. *Nutrients*, 3(12): 529—554
- Corne S J, Pickering R W, Warner B T, 1963. A method for assessing the effects of drugs on the central actions of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol Chemother*, 20: 106—120
- Elliott P J, Chan J, Parker Y M *et al*, 1986. Behavioral effects of neurotensin in the open field: structure-activity studies. *Brain Res*, 381: 259—265
- Farley J H, Clear N P, Leroy B *et al*, 2006. Age, growth and preliminary estimates of maturity of bigeye tuna, *Thunnus obesus*, in the Australian region. *Mar Freshwater Res*, 57(7): 713—724
- Galdino P M, Nascimento M V M, Sampaio B L *et al*, 2009. Antidepressant-like effect of *Lafloensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. *J Ethnopharmacol*, 124(3): 581—585
- Lopez A D, Murray C C J L, 1998. The global burden of disease, 1990—2020. *Nat Med*, 4: 1241—1243
- Mischoulon D, Catherine B P, Michael L *et al*, 2008. A double-blind dose-finding pilot study of docosahexaenoic acid (DHA) for major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*, 18(9): 639—645
- Mozaffari-Khosravi H, Yassini-Ardakani M, Karamati M *et al*, 2013. Eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid in mild-to-moderate depression: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Neuropsychopharmacol*, 23(7): 636—644
- Porsolt R D, 1981. Behavioral despair. In: Enna S J, Malick J B, Richelson E eds. *Antidepressants: Neurochemical Behavioral and Clinical Perspectives*. New York: Raven Press, 129—139
- Porsolt R D, Bertin A, Jalfre M, 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 229(2): 327—336
- Sánchez-Mateo C C, Bonkanka C X, Rabanal R M, 2009. *Hypericum grandifolium* Choisy: A species native to Macaronesian Region with antidepressant effect. *J Ethnopharmacol*, 121(2): 297—303
- Siriwardhana N, Kalupahana N S, Moustaid-Moussa N, 2012. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv Food Nutr Res*, 65: 211—222
- Steru L, Chermat R, Thierry B *et al*, 1985. The tail suspension

- test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3): 367—370
- Tallarida R J, Murray R B, 1987. *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*, 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 110—134
- Thase M E, 2003. Evaluating antidepressant therapies: remission as the optimal outcome. *J Clin Psychiatry*, 64(Suppl. 13): 18—25
- Tian Y, 2010. Research progress of clinical antidepressant drugs. *J China Traditional Chinese Medicine Information*, 2: 175
- Willner P, 1984. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*, 83(1): 1—16

DHA AND EPA FROM ORBITAL FLESH OF TUNA *KATSUWONUS PELAMIS*: EXTRACTION AND ITS ANTIDEPRESSANT ACTIVITY

LI Hai-Bo¹, LV Qian-Qian², BAI Dong², WANG Huan², GUAN Li-Ping², XIE Chao²

(1. *Zhejiang International Maritime College, Zhoushan 316021, China*; 2. *Key Laboratory of Health Risk Factors for Seafood of Zhejiang Province, College of Food and Medicine, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China*)

Abstract To explore the use of leftover from skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* food industry, the orbital flesh was utilized for DHA and EPA extraction and their effects of antidepressant activity were studied. The extracted DHA and EPA were oral administrated in dosage at 50, 100, and 300mg/kg onto mice. Antidepressant effect was investigated via forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST) on mice. Results show that the lower dose (50mg/kg) group showed the most active effect. In addition, the DHA and EPA produced a slight potentiation of 5-HT-induced head twitches and syndrome. In addition, major monoamine neurotransmitters and their metabolites in mouse brain regions were determined by HPLC-ECD (High performance liquid chromatography –electrochemical detection). It was found that the DHA and EPA could significantly increase the concentrations of the neurotransmitters 5-HT and norepinephrine in the hippocampus, hypothalamus, and cortex; and reduce the 5-HT metabolism. Therefore, the leftover can be reused to extract DHA and EPA for antidepressant treatment as revealed in mice test. The practice opened a green way to make use of industrial waste for the sakes of human health and better environment.

Key words *Katsuwonus pelamis*; DHA; EPA; antidepressant activity; 5-hydroxytryptophan; neuro-transmitters