

## 基于CREB/BDNF通路探讨鸡血藤总黄酮对抑郁大鼠 海马神经可塑性的影响

赖克道, 李冬梅, 韦桂宁, 韦洁, 何飞, 陆国寿, 韦冬梅, 李懿, 曹斌, 何俊慧\*  
(广西壮族自治区中医药研究院 广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022)

**[摘要]** 目的:观察鸡血藤总黄酮的抗抑郁作用,并探讨其作用机制。方法:50只KM小鼠随机分为正常组,鸡血藤总黄酮高、中、低剂量组(1,0.5,0.25 g·kg<sup>-1</sup>),灌胃给予相应剂量药物,连续给药12 d,末次给药1 h后记录小鼠强迫游泳不动时间和悬尾不动时间。SD大鼠随机分为正常组,模型组,氟西汀组(5 mg·kg<sup>-1</sup>),鸡血藤总黄酮高、低剂量组(1,0.25 g·kg<sup>-1</sup>),每天随机给予2种不同刺激,诱导慢性不可预知应激模型,连续给药21 d,实验结束后,通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清中神经递质及炎症因子的水平;通过苏木素-伊红(HE),尼氏(Nissl)染色观察大鼠海马神经元的变化;通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠海马组织中核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )mRNA的表达水平;通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马组织中C反应元件结合蛋白(CREB),磷酸化(p-)CREB,脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平。结果:与正常组比较,鸡血藤总黄酮能明显缩短小鼠的悬尾和游泳不动时间( $P<0.05$ );与正常组比较,模型组大鼠蔗糖摄入量和旷野活动量减少( $P<0.01$ ),5-HT,DA,NE的水平降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),MAO,IL-6,TNF- $\alpha$ 的水平降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),神经元受损,TNF- $\alpha$ ,NF- $\kappa$ B mRNA水平升高( $P<0.01$ ),BDNF,CREB蛋白表达降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,鸡血藤总黄酮能明显升高大鼠蔗糖摄入量 and 旷野活动量( $P<0.05$ );升高血清中5-HT,DA,NE的水平( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),降低血清中MAO,IL-6,TNF- $\alpha$ 的水平( $P<0.05$ , $P<0.01$ );降低大鼠海马组织中炎症因子NF- $\kappa$ B,TNF- $\alpha$  mRNA的水平( $P<0.01$ );升高大鼠海马组织中CREB,BDNF蛋白的表达( $P<0.05$ , $P<0.01$ );改善大鼠海马组织的病理症状。结论:鸡血藤总黄酮通过激活CREB/BDNF信号通路,改善大鼠海马神经元,减轻抑郁病理损伤,从而减轻抑郁症状。

**[关键词]** 鸡血藤; 抑郁; 脑源性神经营养因子(BDNF); C反应元件结合蛋白(CREB); 神经可塑性

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)05-0055-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220205

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211125.1408.003.html>

**[网络出版日期]** 2021-11-25 19:08

### Total Flavones of Spatholobi Caulis Regulate Hippocampal Neuroplasticity in Depressed Rats Through CREB/BDNF Pathway

LAI Ke-dao, LI Dong-mei, WEI Gui-ning, WEI Jie, HE Fei, LU Guo-shou, WEI Dong-mei,  
LI Yi, CAO Bin, HE Jun-hui\*

(Guangxi Key Laboratory of Chinese Medicine Quality Standard, Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect and mechanism of total flavones of Spatholobi Caulis (TFSC) against depression in rats. **Method:** The fifty KM mice were randomly divided into the normal group and high-, medium-, and low-dose (1, 0.5, 0.25 g·kg<sup>-1</sup>) TFSC groups and gavaged with the corresponding

**[收稿日期]** 20210914(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81960729,81703769,81560663,81360653);广西自然科学基金项目(2018GXNSFDA281046);广西科技计划项目(AD18216002);广西中医药重点学科建设项目(GZXK-Z-20-75);广西中药质量标准研究重点实验室自主研究项目(桂中重自201902);广西中医药适宜技术开发与推广项目(GZSY22-07)

**[第一作者]** 赖克道,副主任药师,从事中药药理学研究,Tel:0771-5830012,E-mail:laikedao@163.com

**[通信作者]** \*何俊慧,硕士,助理研究员,从事中药药理学研究,Tel:0771-5869102,E-mail:hejunhui202109@163.com

drugs for 12 successive days. One hour after the last administration, the immobility time in forced swimming test and tail suspension test was recorded. The SD rats were randomly divided into the normal group, model group, fluoxetine ( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group, and high- and low-dose ( $1, 0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) TFSC groups. Following the exposure of rats to two different kinds of stimuli daily for inducing chronic unpredictable stress, they were administered with the corresponding drugs for 21 d. After the experiment, the levels of serum neurotransmitters and inflammatory factors in rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The changes in hippocampal neurons of rats were observed by hematoxylin-eosin (HE) and Nissl staining. The mRNA expression levels of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the hippocampus of rats were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein expression levels of cAMP-response element binding protein (CREB), phosphorylated CREB (p-CREB), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampal tissues by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, TFSC significantly shortened the immobility time of mice in tail suspension and swimming tests ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal group, the model group exhibited reduced sucrose intake and wilderness activity ( $P < 0.01$ ), decreased 5-HT, DA, NE ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), MAO, IL-6, TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), damaged neurons, increased mRNA levels of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa\text{B}$  ( $P < 0.01$ ), and down-regulated BDNF and CREB protein expression ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, TFSC significantly enhanced sucrose intake and wilderness activity of rats ( $P < 0.05$ ), increased the serum 5-HT, DA and NE ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and decreased the serum MAO, IL-6, and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) as well as NF- $\kappa\text{B}$  and TNF- $\alpha$  mRNA expression ( $P < 0.01$ ), up-regulated the protein expression levels of BDNF and CREB ( $P < 0.01$ ), and improved the pathological symptoms of hippocampus. **Conclusion:** TFSC improved the hippocampal neurons of rats via CREB/BDNF signaling pathway and reduced depressive pathological damage, thus relieving depression.

**[Keywords]** Spatholobi Caulis; depression; brain-derived neurotrophic factor (BDNF); cAMP-response element binding protein (CREB); neuroplasticity

重度抑郁症(MDD)是一种常见的神经精神疾病,影响着全世界超过3.5亿人口,而慢性压力是重度抑郁症重要的发展因素<sup>[1-2]</sup>。由其引起的神经可塑性功能障碍参与了MDD的发病机制<sup>[3-4]</sup>,且可导致脑源性神经营养因子(BDNF)的表达和信号传导持续降低,从而损害或阻碍其可塑性,促进内侧前额皮层和海马神经元萎缩和突触丢失<sup>[5]</sup>,这些改变可导致机体对环境不适应,影响学习和应对压力的能力。因此,改善BDNF的表达可以改善神经可塑性,从而改善抑郁样行为。近年来,针对神经可塑性的研究已成为开发新型抗抑郁药的突破口,抑郁症中神经可塑性的详细机制仍不清楚。因此,对神经可塑性的研究将为抑郁症的康复治疗开辟新的途径,从神经可塑性的角度探究抑郁症的发病机制将成为一种很有前景的预防和治疗抑郁症的方法。

鸡血藤为豆科植物密花豆的干燥藤茎<sup>[6]</sup>,也是“广西桂十味”药材之一。现代药理学研究表明,鸡血藤具有抗动脉粥样硬化<sup>[7]</sup>,抗菌<sup>[8]</sup>,治疗骨质疏松<sup>[9]</sup>等作用。本课题组前期研究也表明鸡血藤水提物具有明显的抗抑郁作用<sup>[10]</sup>。但是其抗抑郁作用

的主要活性成分尚未明晰,为进一步探究鸡血藤抗抑郁作用的主要活性成分是否在总黄酮部分,及其潜在抗抑郁作用机制,在前期研究的基础上,本研究采用鸡血藤总黄酮部位进行抗抑郁作用机制研究,通过小鼠强迫游泳实验、悬尾实验初步明确其抗抑郁作用,进而通过建立慢性不可预知应激大鼠模型探讨其相关作用机制,以期将鸡血藤开发成为新型抗抑郁药提供实验依据及理论基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 50只雄性SPF级KM小鼠,体质量18~22 g,雄性SPF级SD大鼠,体质量180~220 g,均购于长沙市天勤生物技术有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0014。实验动物饲养于广西壮族自治区中医药研究院SPF级动物房中,使用许可证号SYXK(桂)2016-0006。动物房环境温度为(22±3)℃,相对湿度为(60±5)%,12 h明暗交替。本实验经广西壮族自治区中医药研究院动物实验中心伦理委员会批准(批准号2021031103)。

**1.2 药物及试剂** 鸡血藤,广西仙茱中药科技有限公司,批号20210201,经广西壮族自治区中医药研

究院黄云峰副研究员鉴定为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* 的干燥藤茎。鸡血藤总黄酮的制备:鸡血藤药材,称取1 000 g,分别70%乙醇加6 L回流提取2次,每次1 h,过滤,滤液回收浓缩,大孔吸附树脂洗脱,即得,总黄酮含量58%。氟西汀(礼来苏州制药有限公司,批号21201A);5-羟色胺(5-HT)试剂盒,单胺氧化酶(MAO)试剂盒,多巴胺(DA)试剂盒,去甲肾上腺素(NE)试剂盒,白细胞介素-6(IL-6)试剂盒,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )试剂盒(上海泛柯实业有限公司,批号均为sep2020);4%多聚甲醛溶液(上海源叶生物科技有限公司,批号L23S11G125611S);无水乙醇、异丙醇(广东光华科技股份有限公司,批号分别为20200729, NO20140115);三氯甲烷(成都市科隆化学品有限公司,批号2019010801);TRIzol[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号317910];反转录试剂盒和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号分别为7E540C1, 7E221C8);C反应元件结合蛋白(CREB),BDNF,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)辣根过氧化物酶(HRP)偶联抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为12208-1-AP, 66292-1-Ig, 10494-1-AP, SA00001-2);磷酸化(p)-CREB抗体(美国Abcam公司,货号ab32096);BCA蛋白浓度测定试剂盒,蛋白转膜液(碧云天生物技术有限公司,批号分别为120720210806, 022021210615);电泳液(苏州新赛美生物技术有限公司,批号N20210426);苏木素-伊红(HE)染色液(北京雷根生物技术有限公司,批号1009A19);甲苯胺蓝染液(武汉赛维尔生物技术有限公司,批号G1032)。

**1.3 仪器** Synergy H1型多功能酶标检测仪(美国伯腾仪器有限公司);EVOS FL Auto型全自动细胞成像系统,Nanodrop One型超微量核酸蛋白测定仪[美国赛默飞世尔科技(中国)有限公司];ASP300型封闭式全自动组织脱水机,EG1140型分体式组织包埋机,RM2145型半自动轮转式切片机(德国徕卡微系统股份公司);LightCycler 480 II型Real-time PCR仪(瑞士罗氏制药公司);Mini-PROTEAN Tetra型电泳仪,Mini Trans-Blot cell型转膜仪[伯乐生命科学产品(上海)有限公司]。

## 2 方法

**2.1 鸡血藤总黄酮对小鼠悬尾实验(TST)的影响** 雄性KM小鼠随机分为正常组,氟西汀组(盐酸氟

西汀 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),鸡血藤总黄酮高、中、低剂量组( $1, 0.5, 0.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,分别相当于鸡血藤药材 $10, 5, 2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),每组10只。正常组给予同等体积的蒸馏水,其他各组均连续灌胃给药12 d,末次给药1 h后测试。参照文献[11-12]的方法,将单个小鼠尾端(在距尾尖部约2 cm处)用医用胶布粘于悬尾箱(30 cm $\times$ 30 cm $\times$ 25 cm)上部支架上,使小鼠成倒挂状态,头部离箱底约5 cm。悬挂时间为6 min,统计后4 min内累计不动时间(不动状态指小鼠停止挣扎不动或无任何活动)。

**2.2 鸡血藤总黄酮对小鼠强迫游泳实验(FST)的影响** 动物采用同2.1项的分组及给药方法,末次给药1 h后测试。参照文献[11-12]的方法,将小鼠单独放入高20 cm,直径14 cm的圆柱形玻璃缸中,缸内水深10 cm,水温( $25\pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,从小鼠入水后计时6 min,记录后4 min内游泳累计不动时间(不动状态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 鸡血藤总黄酮对慢性不可预知温和应激(CUMS)大鼠抑郁症的影响** 动物随机分为5组,分别为正常组、模型组、阳性药组(盐酸氟西汀 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和鸡血藤总黄酮高、低剂量组( $1, 0.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,分别相当于鸡血藤药材 $10, 2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。实验前大鼠预适应1周,自由饮食饮水。除空白对照组外,其余动物进行慢性温和不可预见性刺激造模<sup>[13]</sup>。每日随机给予动物2种刺激,冰水游泳6 min,噪音2 h,通宵照明,昼夜颠倒,倾斜 $45^{\circ}$ 12 h,夹尾2 min,禁食24 h,禁水2 h,湿垫料12 h,孤笼饲养48 h或拥挤12 h。造模同时进行灌胃给药,给药组动物按照 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体积灌胃给予不同剂量的鸡血藤总黄酮和盐酸氟西汀。连续给药4周后,进行行为学检测。

**2.4 糖水偏好实验** 用大小相同的水瓶,分别装有1%蔗糖水和饮用水,同时给予大鼠,预适应48 h后撤去水瓶。大鼠禁食禁水12 h后,测定大鼠1 h内1%蔗糖水消耗量与饮用水的消耗量。计算蔗糖水摄入百分比。蔗糖水摄入百分比=糖水消耗量/(糖水消耗量+饮用水消耗量) $\times 100\%$

**2.5 旷野实验** 旷野实验观察时,将动物放于直径40 cm的圆形白板的中心位置观察30 s,观察不同组中大鼠呆在圈内的时间。

**2.6 ELISA检测血清中神经递质及炎症因子的水平** 实验结束后,大鼠腹主动脉取血,于离心机中 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径11.3 cm),取上

清,放于-20℃备用。根据试剂盒说明书检测血清中5-HT,DA,MAO,NE,IL-6,TNF- $\alpha$ 的水平。

**2.7 HE染色观察大鼠海马组织** 取大鼠脑组织固定于4%多聚甲醛中,石蜡包埋,切片(5  $\mu$ m),二甲苯脱蜡各10 min,梯度乙醇复水各5 min,苏木素染色5 min,75%盐酸乙醇分化,自来水冲洗返蓝,伊红染色3 min,自来红冲洗,梯度乙醇脱水各10 s,二甲苯透明1 min,晾干,中性树脂封片。

**2.8 Nissl染色观察大鼠海马神经元** 石蜡切片依次经二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水,自来水洗,甲苯胺蓝染色约2~5 min,镜检,自来水清洗,烤干,再入染液染色2~5 min,水洗,0.1%的冰乙酸分化,自来水洗终止反应,镜检,水洗,烤干,二甲苯透明10 min,中性树脂封片。显微镜下尼氏体呈紫色,细胞核呈淡紫色。

**2.9 Real-time PCR检测大鼠海马中IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B mRNA的水平** 称取大鼠海马约30 mg,加入裂解液1 mL,按说明书步骤提取总RNA,使用微量核酸蛋白测定仪测定RNA浓度,然后根据逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA,最后根据试剂盒说明书进行扩增。TNF- $\alpha$ 引物序列上游5'-TTCCAATGGGCTTTCGGAAC-3',下游5'-AGACA TCTTCAGCAGCCTTGTGAG-3',长度118 bp;NF- $\kappa$ B引物序列上游5'-TCCGAACTCCCCATACGCT-3',下游5'-GCGAT CGTCTGTGTCTGGCA-3',长度131 bp;GAPDH引物序列上游5'-GACAGCCGCAT CTTCTTGTG-3',下游5'-GAGAAGGCAGCCCTGG TAAC-3',长度112 bp。引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。反应体系20  $\mu$ L,95℃预变性30 s,循环反应95℃10 s,60℃30 s,溶解曲线95℃15 s,60℃60 s,95℃15 s,共40个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA表达水平。

**2.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马中CREB, p-CREB, BDNF蛋白的表达水平** 称取大鼠海马组织,加入裂解液,提取总蛋白,BCA法测定蛋白质浓度,加入相应量Loading buffer,混匀,95℃加热15 min,制胶,上样,电泳,转膜,5%脱脂奶粉封闭1 h, TBST清洗3次,每次5 min,加入CREB, p-CREB, BDNF(1:1 000), GAPDH(1:5 000)等一抗置于4℃冰箱过夜, TBST清洗3次,加入二抗(1:5 000),孵育1 h, TBST清洗3次,加入显影液显影。Image J计算各条带灰度值。

**2.11 统计学方法** 使用SPSS 20.0进行统计学分析,所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对各组数据进行正态性

检验和方差齐性检验,在各组数据均正态分布且方差齐的条件下用One-way ANOVA进行方差分析及t检验进行组间比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对小鼠悬尾不动时间的影响** 与正常组比较,鸡血藤总黄酮高、中、低剂量组和氟西汀组均明显缩短了小鼠的悬尾不动时间( $P<0.05$ )。见表1。

表1 鸡血藤总黄酮对小鼠悬尾不动时间的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of total flavonoids of *Spatholobi Caulis* on immobility time of TST in mice ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	悬尾不动时间/s
正常		127.60±38.91
氟西汀	0.005	79.90±39.88 <sup>1)</sup>
鸡血藤总黄酮	1	77.00±40.04 <sup>1)</sup>
	0.5	88.50±41.00 <sup>1)</sup>
	0.25	91.40±28.82 <sup>1)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ (表2同)。

**3.2 对小鼠强迫游泳的影响** 与正常组比较,鸡血藤总黄酮高、中剂量组及氟西汀组均能明显缩短小鼠游泳不动时间( $P<0.05$ )。见表2。

表2 鸡血藤总黄酮对小鼠强迫游泳不动时间的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of total flavonoids of *Spatholobi Caulis* on immobility time of FST in mice ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	游泳不动时间/s
正常		134.30±48.08
氟西汀	0.005	86.70±27.78 <sup>1)</sup>
鸡血藤总黄酮	1	85.50±42.42 <sup>1)</sup>
	0.5	83.10±57.54 <sup>1)</sup>
	0.25	104.20±58.20

**3.3 对大鼠糖水偏好的影响** 与正常组比较,模型组大鼠蔗糖摄入百分比显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,鸡血藤总黄酮高、低剂量组和氟西汀组大鼠的蔗糖摄入百分比均显著升高( $P<0.01$ )。见表3。

**3.4 对大鼠旷野实验的影响** 与正常组比较,模型组大鼠在圈内保留的时间显著增多( $P<0.01$ );与模型组比较,鸡血藤总黄酮高、低剂量组和氟西汀组大鼠在圈内保留的时间明显减少( $P<0.05$ )。见表4。

**3.5 对大鼠血清神经递质和炎症因子的影响** 与正常组比较,模型组大鼠血清中5-HT,DA,NE的水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),MAO,IL-6, TNF- $\alpha$ 的

表3 鸡血藤总黄酮对大鼠糖水偏好的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of total flavones of *Spatholobi Caulis* on sugar water preference in rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	蔗糖水摄入/%
正常		86.72±9.46
模型		63.20±10.93 <sup>2)</sup>
氟西汀	0.005	76.86±10.02 <sup>4)</sup>
鸡血藤总黄酮	1	77.44±11.50 <sup>3)</sup>
	0.5	75.73±9.26 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表4-7同)。

水平明显升高( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,鸡血藤总黄酮高剂量组大鼠血清中DA,NE,5-HT的水平明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),MAO,IL-6,TNF- $\alpha$ 的水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ );而鸡血藤总黄酮

表4 鸡血藤总黄酮对大鼠旷野活动的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of total flavones of *Spatholobi Caulis* on desert campaign in rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	圈内保留时间/s
正常		15.00±11.92
模型		27.22±5.56 <sup>2)</sup>
氟西汀	0.005	19.89±9.28 <sup>3)</sup>
鸡血藤总黄酮	1	20.22±9.08 <sup>3)</sup>
	0.5	18.00±8.51 <sup>3)</sup>

低剂量组大鼠血清中5-HT,DA,NE的水平均显著升高( $P<0.01$ ),MAO,IL-6,TNF- $\alpha$ 的水平均明显降低( $P<0.05, P<0.01$ );氟西汀组大鼠血清中5-HT,DA,NE的水平均明显升高( $P<0.05$ ),MAO,IL-6,TNF- $\alpha$ 的水平均明显降低( $P<0.05$ )。见表5。

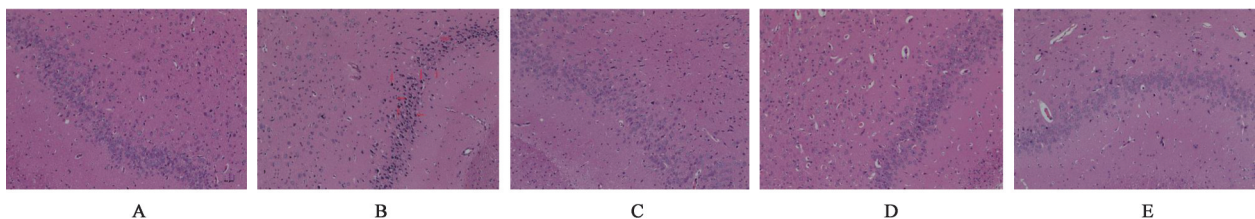
表5 鸡血藤总黄酮对大鼠血清神经递质及炎症因子的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 5 Effect of total flavones of *Spatholobi Caulis* on serum neurotransmitters and inflammatory factors in rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	5-HT/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	DA/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	MAO/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	NE/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-6/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- $\alpha$ / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
正常		14.13±0.60	985.18±51.00	205.39±17.68	4.24±0.27	110.00±4.03	180.59±5.68
模型		13.46±0.45 <sup>1)</sup>	889.64±66.21 <sup>2)</sup>	241.86±11.56 <sup>2)</sup>	3.81±0.38 <sup>1)</sup>	117.66±6.41 <sup>1)</sup>	190.79±6.75 <sup>2)</sup>
氟西汀	0.005	14.11±0.61 <sup>3)</sup>	974.08±63.06 <sup>3)</sup>	202.76±33.65 <sup>3)</sup>	4.19±0.22 <sup>3)</sup>	109.79±4.80 <sup>3)</sup>	181.61±4.48 <sup>3)</sup>
鸡血藤总黄酮	1	14.48±0.52 <sup>4)</sup>	966.43±59.64 <sup>3)</sup>	196.51±27.92 <sup>4)</sup>	4.23±0.23 <sup>3)</sup>	108.19±8.90 <sup>3)</sup>	180.83±6.62 <sup>3)</sup>
	0.5	14.37±0.40 <sup>4)</sup>	1000.95±49.49 <sup>4)</sup>	191.80±18.50 <sup>4)</sup>	4.39±0.17 <sup>4)</sup>	105.56±3.27 <sup>4)</sup>	183.19±5.80 <sup>3)</sup>

3.6 对大鼠海马组织的影响 与正常组大鼠比较,模型组大鼠海马组织中神经元细胞排列紊乱,细胞核固缩,细胞间隙疏松增大;与模型组大鼠比较,鸡

血藤总黄酮高、中、低组及氟西汀组均可明显改善神经元细胞排列紊乱,细胞核固缩,细胞间隙疏松增大病理学变化。见图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 氟西汀组;D. 鸡血藤总黄酮高剂量组;E. 鸡血藤总黄酮低剂量组(图2,3同)

图1 鸡血藤总黄酮对大鼠海马神经元的影响(HE,×20)

Fig. 1 Effect of total flavones of *Spatholobi Caulis* on hippocampal in rats (HE,×20)

3.7 对大鼠海马神经元的影响 结果显示CUMS处理大鼠模型海马神经元受损,主要表现为排列不规则,分层不清,Nissl小体减少、颜色变浅;经鸡血藤总黄酮及氟西汀处理后,以上现象有所改善。见图2。

3.8 对大鼠海马组织中炎症因子mRNA的影响 与正常组比较,模型组大鼠海马组织中TNF- $\alpha$ ,NF- $\kappa$ B mRNA的水平明显升高( $P<0.01$ );与模型组比较,鸡血藤总黄酮高、低剂量组和氟西汀组大鼠

海马组织中TNF- $\alpha$ ,NF- $\kappa$ B mRNA的水平明显降低( $P<0.01$ )。见表6。

3.9 对大鼠海马组织中BDNF,CREB,p-CREB蛋白的影响 与正常组比较,模型组大鼠海马组织中BDNF,p-CREB/CREB蛋白表达显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,鸡血藤总黄酮高、低剂量组的BDNF蛋白表达显著升高( $P<0.01$ );鸡血藤总黄酮高剂量组的p-CREB/CREB表达显著升高( $P<0.01$ );氟西汀组BDNF,p-CREB/CREB表达显著降

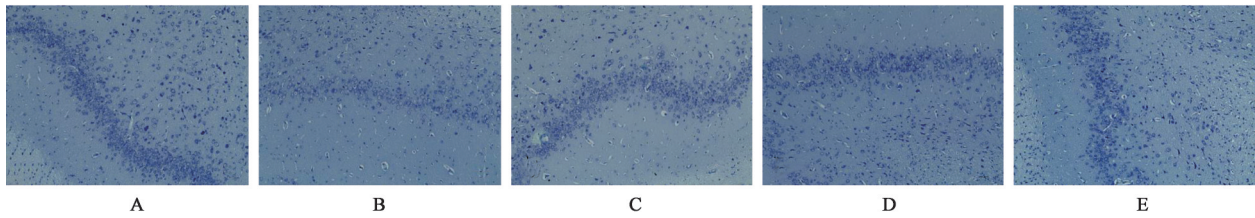


图2 鸡血藤总黄酮对大鼠海马神经元的影响(Nissl, ×20)

Fig. 2 Effect of total flavones of *Spatholobi Caulis* on hippocampal neurons in rats(Nissl, ×20)

表6 鸡血藤总黄酮对大鼠海马组织中炎症因子 mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of total flavones of *Spatholobi Caulis* on mRNA expression of inflammatory factors in hippocampus of rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF-α	NF-κB
正常		1.00±0.30	1.00±0.26
模型		1.69±0.43 <sup>2)</sup>	1.42±0.31 <sup>2)</sup>
氟西汀	0.005	0.55±0.13 <sup>4)</sup>	0.84±0.54 <sup>4)</sup>
鸡血藤总黄酮	1	0.62±0.21 <sup>4)</sup>	0.28±0.14 <sup>4)</sup>
	0.5	0.55±0.22 <sup>4)</sup>	0.13±0.03 <sup>4)</sup>

低( $P<0.01$ )。见图3,表7。

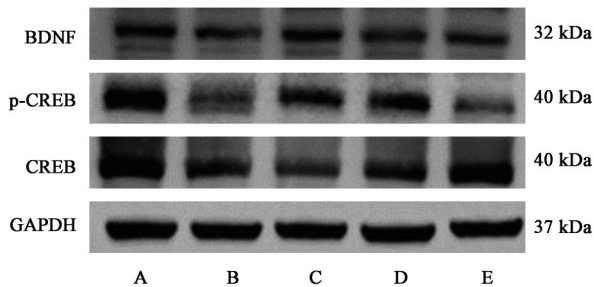


图3 BDNF, CREB, p-CREB和内参GAPDH的蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of BDNF, CREB, p-CREB and GAPDH

表7 鸡血藤总黄酮对大鼠海马组织中BDNF, p-CREB/CREB蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of total flavones of *Spatholobi Caulis* on relative protein expression level of BDNF and p-CREB/CREB of rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	BDNF/GAPDH	p-CREB/CREB
正常		1.00±0.12	1.00±0.06
模型		0.70±0.03 <sup>1)</sup>	0.48±0.03 <sup>1)</sup>
氟西汀	0.005	0.93±0.05 <sup>4)</sup>	1.03±0.13 <sup>4)</sup>
鸡血藤总黄酮	1	0.89±0.07 <sup>3)</sup>	0.85±0.13 <sup>4)</sup>
	0.5	0.85±0.08 <sup>3)</sup>	0.50±0.07

#### 4 讨论

抑郁症的动物模型有20多种,其中,慢性不可预测应激模型的应用最广泛<sup>[14]</sup>,也是目前最常用、最可靠、最有效的啮齿动物抑郁症模型<sup>[15-16]</sup>。该模

型模拟了研究慢性药物治疗效果所需的时间过程和行为变化<sup>[14]</sup>,比如,显著增加动物强迫游泳不动时间和悬尾不动时间(行为绝望);在旷野活动中活动量减少等,而这些正是正常动物在新环境中的本能活动,表明动物探索和兴趣的丧失。

神经可塑性是大脑功能改变和适应的一种显著能力,其基本原理是突触连接的可塑性,这些连接不断被移除或重新建立,这个过程平衡很大程度上取决于神经元的活动<sup>[17]</sup>。神经元是基本的功能单元,整合和传递信号,以响应内在和外在的信息<sup>[18]</sup>。研究表明,神经可塑性功能障碍是抑郁症的基本发病机制<sup>[19]</sup>。而脑源性神经营养因子BDNF的改变是神经可塑性受损的基础<sup>[20]</sup>,研究表明,BDNF在神经元活动和突触可塑性之间的协同相互作用使其成为理想的、重要的调节细胞过程的调节器,这些过程是认知和其他复杂行为的基础<sup>[21]</sup>。另一方面,CREB又是调节BDNF和记忆形成的重要转录因子<sup>[22]</sup>,已经证实转录因子CREB在认知和启动记忆整合中起着关键作用<sup>[23-27]</sup>。因此,激活CREB转录因子调节BDNF的水平对改善神经可塑性功能障碍引起的抑郁症具有重要意义。在本研究中,鸡血藤总黄酮显著升高p-CREB和BDNF的水平,改善神经元受损情况,表明鸡血藤总黄酮可能是通过激活CREB/BDNF信号通路,改善神经可塑性功能障碍,从而起到改善抑郁症作用的。

综上所述,鸡血藤总黄酮能明显缩短小鼠悬尾不动时间和强迫游泳不动时间,升高5-HT等神经递质的水平,降低IL-6等炎症因子的水平,改善大鼠海马神经元的损伤,升高p-CREB, BDNF的表达水平,具有明显的抗抑郁作用,表明鸡血藤总黄酮的作用位点具有多靶点、多环节,因此其在抗抑郁中的复杂作用机制和相关作用物质基础,还有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] BROMET E, ANDRADE L H, HWANG I, et al.

- Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode[J]. *BMC Med*, 2011, 9: 90.
- [ 2 ] KENDLER K S, GARDNER C O. Dependent stressful life events and prior depressive episodes in the prediction of major depression: the problem of causal inference in psychiatric epidemiology [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2010, 67(11): 1120-1127.
- [ 3 ] LIU W, XUE X, XIA J, et al. Swimming exercise reverses CUMS-induced changes in depression-like behaviors and hippocampal plasticity-related proteins [J]. *J Affect Disord*, 2018, 227: 126-135.
- [ 4 ] PRICE R B, DUMAN R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25 (3) : 530-543.
- [ 5 ] DUMAN R S, AGHAJANIAN G K, SANACORA G, et al. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants [J]. *Nat Med*, 2016, 22(3): 238-249.
- [ 6 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:194.
- [ 7 ] 周柳芳,黄照河,杨彩艳,等. 鸡血藤提取物抗动脉粥样硬化的研究进展[J]. *微创医学*, 2020, 15(2) : 216-219.
- [ 8 ] 黄诗琦,韦雅妮,赵雨川,等. 鸡血藤总黄酮对大肠杆菌败血症的治疗作用[J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46(5): 1541-1550.
- [ 9 ] 梁爽,潘颖. 基于网络药理学研究鸡血藤治疗骨质疏松的分子作用机制[J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(3): 472-479, 489.
- [ 10 ] 曹斌,李冬梅,韦桂宁,等. 鸡血藤水提物抗抑郁作用研究[J]. *中药材*, 2017, 40(9): 2172-2176.
- [ 11 ] SHI B, LUO J, FANG Y, et al. Xiaoyao pills prevent lipopolysaccharide-induced depression by inhibiting inflammation and protecting nerves [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1324-1324.
- [ 12 ] 韦桂宁,楚世峰,苏华,等. 拟黑多刺蚁醇提物抗抑郁作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(9): 1280-1286.
- [ 13 ] PENG Z, ZHANG C, YAN L, et al. EPA is more effective than DHA to improve depression-like behavior, glia cell dysfunction and hippocampal apoptosis signaling in a chronic stress-induced rat model of depression [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5) : 1769.
- [ 14 ] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 93(3): 358-364.
- [ 15 ] ANTONIUK S, BIJATA M, PONIMASKIN E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: eta-analysis of model reliability [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 99: 101-116.
- [ 16 ] 陈可琢,陈实,任洁贻,等. 茯苓酸性多糖抗抑郁作用及其调节神经递质和NLRP3通路机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(19): 5088-5095.
- [ 17 ] LIU W, GE T, LENG Y, et al. The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex [J]. *Neural Plast*, 2017, doi: 10. 1155/2017/6871089.
- [ 18 ] WAINWRIGHT S R, GALEA L A. The neural plasticity theory of depression: assessing the roles of adult neurogenesis and PSA-NCAM within the hippocampus [J]. *Neural Plast*, 2013, doi: 10. 1155/2013/805497.
- [ 19 ] KUHN M, HOGER N, FEIGE B, et al. Fear extinction as a model for synaptic plasticity in major depressive disorder [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115280.
- [ 20 ] LEVY M J F, BOULLE F, STEINBUSCH H W, et al. Neurotrophic factors and neuroplasticity pathways in the pathophysiology and treatment of depression [J]. *Psychopharmacology*, 2018, 235: 2195-2220.
- [ 21 ] BJORKHOLM C, MONTEGGIA L M. BDNF-a key transducer of antidepressant effects [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 102: 72-79.
- [ 22 ] ROSA E, FAHNESTOCK M. CREB expression mediates amyloid  $\beta$  -induced basal BDNF downregulation [J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(8) : 2406-2413.
- [ 23 ] 王玉露,芦锰,王月月,等. 蒲郁胶囊对抑郁小鼠行为学、HPA轴及海马CREB-BDNF通路表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(20): 4971-4977.
- [ 24 ] LEE Y S, SILVA A J. The molecular and cellular biology of enhanced cognition [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(2): 126-40.
- [ 25 ] KALDUN J C, SPRECHER S G. Initiated by CREB: resolving gene regulatory programs in learning and memory: switch in cofactors and transcription regulators between memory consolidation and maintenance network [J]. *Bioessays*, 2019, 41(8) : e1900045.
- [ 26 ] 王冰梅,乔盼,王微,等. 合欢花-远志单味药及药对对慢性不可预知应激大鼠抑郁样行为及海马CREB, NOX2表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(17): 32-39.
- [ 27 ] 凌志峰,罗洪斌,谢枫枫,等. 柴胡越鞠汤对CUMS诱导的抑郁症模型大鼠治疗作用及其机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(21): 68-76.

[责任编辑 周冰冰]