

# 黄豆苷元对抑郁模型小鼠行为及海马 DG 区病理形态学影响

王睿<sup>1,2</sup>, 张晓杰<sup>2</sup>, 李炎<sup>1</sup>, 黄树明<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学 中医药研究院, 哈尔滨 150040;

2. 齐齐哈尔医学院 医药科学研究中心, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** **目的:**探讨黄豆苷元的抗抑郁作用及其机制。**方法:**昆明种小鼠随机分为正常组、模型组、氟西汀组(3.0 mg·kg<sup>-1</sup>, ig)、黄豆苷元低、中、高剂量组(10, 20, 40 mg·kg<sup>-1</sup>, ig), 每组 10 只。给药组每日应激前 1 h ig 给药, 共 21 d。采用慢性不可预知性温和应激(CUMS)法建立抑郁小鼠模型, 通过体重和旷场实验检测小鼠抑郁样行为; 采用尼氏染色法检测海马 DG 区神经元病理形态学变化; TUNEL 法检测神经元凋亡情况。**结果:**与正常组比较, 模型组小鼠出现明显的行为学异常, 表现为体重减少( $P < 0.01$ ); 旷场实验水平运动及垂直运动得分减少( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 尼氏染色显示海马 DG 区神经元形态不规则, 细胞分层不清; TUNEL 法显示神经元凋亡数量增加( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 氟西汀组及黄豆苷元低、中、高剂量组小鼠行为学异常均有明显改善, 小鼠体重增加( $P < 0.01$ ), 旷场实验水平运动及垂直运动得分增加( $P < 0.01$ ); 海马 DG 区神经元损伤性变化减轻; 神经元凋亡率减少, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论:**黄豆苷元可能通过减少神经元凋亡改善 CUMS 抑郁模型小鼠行为学异常, 产生抗抑郁作用。

**[关键词]** 黄豆苷元; 抑郁症; 行为学; 海马; 凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0136-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080136

**Effects of Daidzein on Behavior and Pathological Morphology in Hippocampus DG Area in Mice Model of Depression** WANG Rui<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-jie<sup>2</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, HUANG Shu-ming<sup>1\*</sup> (1. Academy of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Institute of Medicine, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the antidepressant effects of daidzein and its possible mechanism. **Method:** Kunming mice were randomly divided into the normal group, the model group, the Fluoxetine group (3.0 mg·kg<sup>-1</sup>) and the daidzein groups, 10 mice in each group. Low, middle and high dose of daidzein (10, 20, 40 mg·kg<sup>-1</sup>) were administered. The depression model was established by chronic unpredictable mild stress (CUMS), the body weight and times of grooming in the open field test were detected respectively. Mice in each group was gavaged before one hour of the daily stress. The normal group and the model group were given physiological saline for a total of 21 days. The behavior changes of body mass were observed by open field test in mice, and apoptosis of hippocampal neural cell morphology and cell DG area in mice brain tissue were observed by Nissl staining and TUNEL method. **Result:** Compared with the normal group, the body weight of model group was reduced ( $P < 0.01$ ), the score of levels and vertical motion in the open field test were decreased in model group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), hippocampus neural cells in DG area was showed irregularly by Nissl staining and the number of apoptotic cells were increased, the difference of statistical was significance ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the behavior score was improved in the Fluoxetine group and each daidzein group, the body weights of mice were increased ( $P < 0.01$ ), the score of levels and vertical motion in the open field test were increased ( $P < 0.01$ ), the changes of hippocampus were reduced. **Conclusion:** Daidzein can improve the behavior anomalie in mice who were induced by CUMS and have neuroprotective effect. The mechanism may be

**[收稿日期]** 20141009(003)

**[基金项目]** 黑龙江省自然科学基金面上项目(D200955)

**[第一作者]** 王睿, 硕士, 副研究员, 从事心境障碍的发病机制及中医药防治研究, Tel: 13763517168, E-mail: wrdoctor1975@163.com

**[通讯作者]** \* 黄树明, 博士生导师, 教授, 从事脑老化的发病机制及中医药防治研究, E-mail: huangsm1958@163.com

related to improving the nerve cell apoptosis.

[Key words] daidzein; depression; behavior; hippocampus; apoptosis

抑郁症为心境障碍的一种临床症状,因其致病危险因素多、病因不清、发病机制复杂,一直成为精神医学科学界的难题<sup>[1]</sup>。“海马神经再生障碍”假说的提出,为抑郁症的机制阐明及防治提供了新的思路<sup>[2]</sup>。海马是脑内边缘系统重要结构之一,作为学习、记忆及情感调节的关键区参与应激和情绪调节,对应激反应敏感且易损伤。应激性生活事件是抑郁症最主要的促发因素,抑郁症患者存在不同程度的海马损伤<sup>[3]</sup>。

黄豆苷元(daidzein)为大豆异黄酮中3种苷元的1种,存在于多种豆科类植物中,对脑神经具有营养保护作用<sup>[4]</sup>。本实验应用慢性不可预知性温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)复制小鼠抑郁模型,通过观察小鼠行为学、脑海马DG区病理形态学及神经细胞凋亡的变化,探讨黄豆苷元抗抑郁作用及其机制。

## 1 材料

**1.1 药品与试剂** 黄豆苷元(新乡恒久远药业,批号20121201);盐酸氟西汀(苏州礼来制药,批号2076AC);TUNEL检测试剂盒(武汉博士德,批号MK1020)。

**1.2 仪器** 旷场反应箱(自制),ECLIPSE-50i型显微镜(日本Nikon),202-0AB型电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司),KD-TS3D1型全自动生物组织脱水机(浙江科迪仪器设备有限公司),TB-718L型生物组织自动包埋机(湖北泰维科技实业有限公司),R138型轮转式切片机(湖北泰维科技实业有限公司)等。

**1.3 动物** 清洁级昆明种雌性小鼠9~10周龄,体重(20±2)g,购自黑龙江中医药大学实验动物中心,合格证号SCXK(黑)2013-0004。

## 2 方法

**2.1 动物模型制备、分组与给药** 实验前将小鼠适应性饲养1周,条件为室温(22±1)℃,湿度(50±10)%,噪音≤60 dB,昼夜节律12L/12D。采用旷场实验行为学评分筛选评分相近、体重均匀的80只小鼠作为实验动物,随机分为空白对照组、模型组、氟西汀(3.0 mg·kg<sup>-1</sup>, ig)组、黄豆苷元低、中、高剂量(10, 20, 40 mg·kg<sup>-1</sup>, ig)组,各组均为10只。采用孤养加CUMS方法造模<sup>[5]</sup>,CUMS主要包括夹尾(1 min),禁水(24 h),禁食(24 h),45℃环境(5 min),

昼夜颠倒(24 h),水平振荡(30 min, 160次/min)和4℃冰水游泳(5 min)等刺激,这7种刺激每天随机采取1种,共计21 d。对照组5只/笼饲养,其余各组1只/笼。给药组每日应激前1 h灌胃给药,空白对照组和模型组给予等体积生理盐水。

## 2.2 指标测定

**2.2.1 体重测定** 在实验第1, 21天分别检测小鼠体重并记录。

**2.2.2 旷场实验(open-field test, OFT)** 小鼠旷场反应箱25 cm×25 cm×38 cm,内壁涂黑,底面平均分为25个小方格,将动物置于方形旷场中心,室内隔音,摄像系统记录动物在旷场内3 min的行为表现<sup>[6]</sup>。两只动物之间以70%的乙醇清洗方箱周壁及底板,以免上次动物余留的异味影响下次实验结果,并计算旷场实验水平运动(4爪均在同1格内为1分,穿越1格计1分,如小鼠沿线行走,以每5 cm为1分)及垂直运动(直立次数,双足离开底面为标志)得分。实验于第1, 21天(9:00~10:00),各测得1次。

**2.2.3 海马DG区神经细胞形态学观察** 行为学测试结束后,灌流固定取脑,常规方法脱水包埋,最终切成厚度5 μm得连续冠状位切片,每隔4~6张切片收片1张。尼氏染色并于光镜下观察小鼠脑组织神经细胞形态。

**2.2.4 神经细胞凋亡检测** 采用TUNEL法并用DAB显色,细胞核呈现黄褐色为阳性细胞,即凋亡细胞。每张小鼠海马DG区切片随机取5个高倍视野,计数100个细胞,计算凋亡细胞百分率。

**2.3 统计学分析** 所有数据经SPSS 19.0软件进行统计分析。计量数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据采用单因素方差分析,组间均数比较采用LSD方法,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

## 3 结果

**3.1 各组小鼠体重测定** 造模开始(第1天)各组小鼠体重无明显差异。模型组小鼠体重在第21天减少,与正常组比较差异显著( $P < 0.01$ )。氟西汀组、黄豆苷元低、中、高剂量组均可抑制CUMS所致小鼠体重下降,与模型组比较显示统计学差异( $P < 0.01$ )。见表1。

**3.2 旷场实验** 与正常组比较,模型组小鼠在应激第21天旷场实验水平运动得分减少( $P < 0.01$ ),垂

直运动得分减少 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 氟西汀组及黄豆苷元低、中、高剂量组小鼠旷场实验水平

运动以及垂直运动得分均明显增加 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 黄豆苷元对抑郁模型小鼠体重、旷场实验水平运动及垂直运动得分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	体重/g		水平运动/分		垂直运动/分	
		第 1 天	第 21 天	第 1 天	第 21 天	第 1 天	第 21 天
正常	-	20.7 ± 0.5	30.3 ± 1.6	117.2 ± 16.9	116.4 ± 9.9	37.3 ± 8.8	40.7 ± 5.3
模型	-	20.6 ± 0.3	15.5 ± 0.4 <sup>1)</sup>	114.2 ± 7.6	47.8 ± 5.4 <sup>1)</sup>	36.3 ± 5.0	27.6 ± 3.2 <sup>1)</sup>
氟西汀	3	20.7 ± 0.2	27.0 ± 0.8 <sup>2)</sup>	115.7 ± 7.3	75.3 ± 8.5 <sup>2)</sup>	35.3 ± 8.2	36.9 ± 3.3 <sup>2)</sup>
黄豆苷元	10	20.9 ± 0.6	25.0 ± 1.1 <sup>2)</sup>	116.9 ± 3.4	70.8 ± 8.4 <sup>2)</sup>	37.4 ± 7.7	28.2 ± 8.6
	20	20.9 ± 0.9	28.5 ± 1.1 <sup>2)</sup>	115.2 ± 12.1	92.8 ± 7.2 <sup>2)</sup>	37.9 ± 5.6	34.1 ± 6.4 <sup>3)</sup>
	40	20.5 ± 0.8	26.4 ± 1.3 <sup>2)</sup>	116.8 ± 5.9	76.5 ± 15.6 <sup>2)</sup>	37.3 ± 10.3	30.3 ± 9.6

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

**3.3 海马 DG 区神经细胞形态观察** 正常组小鼠脑组织 DG 区海马神经元分层明显, 细胞排列规则, 胞膜结构完整, 胞核形态正常, 尼氏小体清楚而数量多, 未见明显神经元损伤; 模型组海马 DG 区神经元排列规则, 除偶见细胞核皱缩变小外, 未见明显损伤; 氟西汀组、黄豆苷元低、中、高剂量组均显示细胞分层较为清晰, 尼氏小体清晰呈现颗粒状, 各组均未见明显的海马 DG 区神经元损伤。见图 1。

**3.4 小鼠海马 DG 区神经细胞凋亡** 与正常组比较, 模型组小鼠海马 DG 区凋亡染色阳性细胞增加, 胞核呈现棕黄色或黄褐色颗粒或团块, 表现出凋亡的特征。与模型组比较, 氟西汀组, 黄豆苷元低、中、高剂量组小鼠海马 DG 区神经元凋亡减少 ( $P < 0.01$ )。见图 2, 表 2。

表 2 黄豆苷元对小鼠海马 DG 区神经元凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 2 Effects of daidzein on neuronal apoptosis in hippocampal DG area in mice model of depression ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	细胞凋亡率/%
正常	-	3.5 ± 1.6
模型	-	15.1 ± 2.7 <sup>1)</sup>
氟西汀	3	8.0 ± 1.6 <sup>2)</sup>
黄豆苷元	10	11.1 ± 2.3 <sup>2)</sup>
	20	9.1 ± 1.9 <sup>2)</sup>
	40	9.3 ± 2.6 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

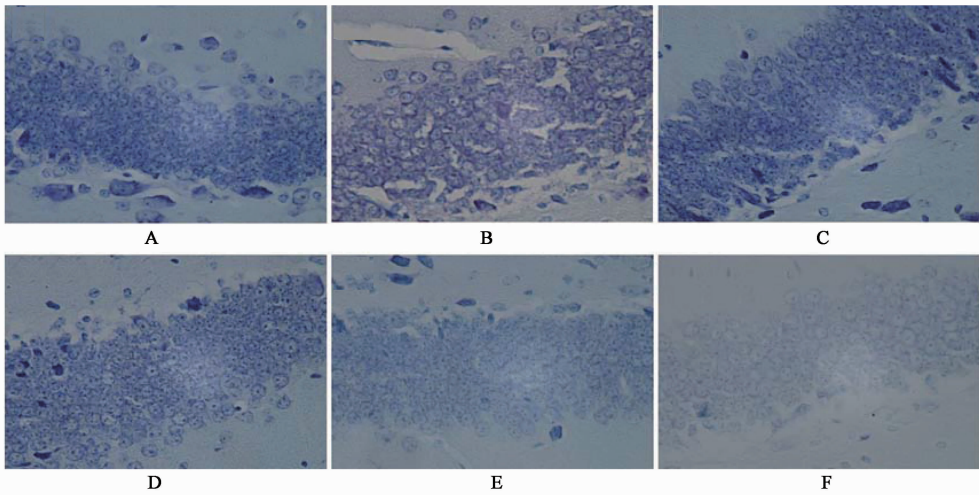
#### 4 讨论

抑郁症属于精神心理疾病范畴, 其发病机制至今尚不清楚, 有研究表明, 抑郁症发病与应激密切相关。理想的动物模型对于研究抑郁症的病因、发病

机制及评价抗抑郁药物疗效至关重要。CUMS 模型是常用的抑郁症动物模型, 该模型可以模拟人类抑郁情况, 具有稳定性好、重复性佳的优点, 因此, 笔者采用 CUMS 结合孤养方式建立小鼠抑郁模型。旷场实验, 体重检测是评价啮齿类实验动物运动功能和焦虑状态的经典行为学方法, 被广泛运用于精神神经药理学、神经行为学等的基础研究。本实验结果显示: 与正常组比较, 模型组小鼠行为异常, 旷场实验水平及垂直运动得分减少, 体重减轻, 说明造模成功。给予黄豆苷元治疗后, CUMS 抑郁动物的相关抑郁行为学改变得以逆转, 说明黄豆苷元具有抗抑郁作用。

海马是脑边缘系统重要结构, 抑郁症与海马功能及结构关系密切, 观察海马形态学改变可能判定应激损伤的程度。“抑郁症海马神经再生障碍”假说是近年提出的关于抑郁发病的学说, 并得到有关抑郁症研究者的广泛认可。该学说认为, “抑郁症的发生与海马神经可塑性失调密切相关”<sup>[3]</sup>。神经可塑性涉及神经元、神经突触及整个神经系统结构和功能的调节。目前通过探讨神经细胞凋亡以及海马神经元再生调控, 以期揭示神经细胞凋亡在抑郁症发生机制中的作用已成为抑郁研究的热点领域。文献研究表明, 抑郁症模型大鼠海马存在不同程度的神经细胞萎缩、细胞发生减少<sup>[7]</sup>及细胞凋亡<sup>[8]</sup>。笔者采取 TUNEL 法检测神经细胞凋亡情况, 结果表明, CUMS 所致小鼠抑郁状态与海马神经细胞形态结构改变及神经细胞凋亡密切相关。

黄豆苷元, 又名大豆苷元, 化学名称 4',7-二羟基异黄酮, 广泛存在于豆科植物中, 同时也是葛根异黄酮的重要成分之一<sup>[4]</sup>。黄豆苷元具有神经保护



A. 正常组; B. 模型组; C. 氟西汀  $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组; D. 黄豆苷元  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组; E. 黄豆苷元  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组; F. 黄豆苷元  $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组 (图 2 同)

图 1 黄豆苷元对抑郁模型小鼠海马 DG 区尼氏小体染色的影响 (尼氏,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effects of daidzein on Nissl stained in hippocampus DG area in mice model of depression (Nissl,  $\times 400$ )

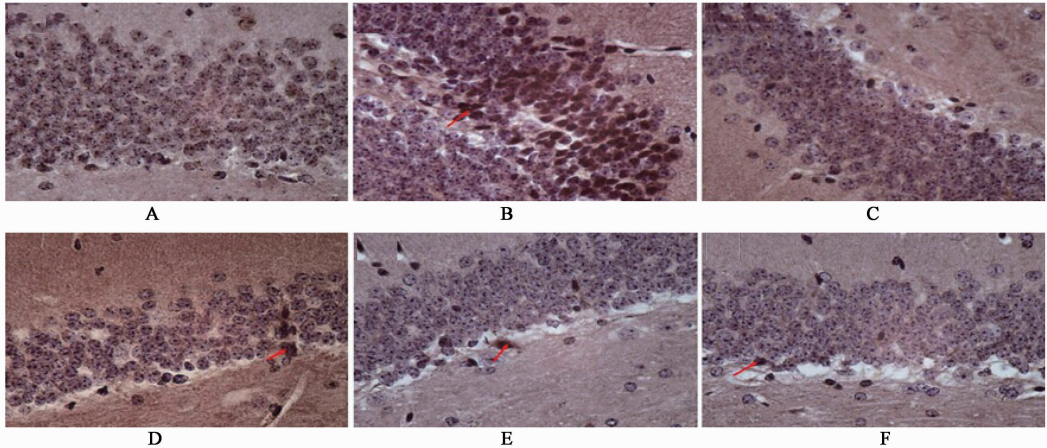


图 2 黄豆苷元对抑郁模型小鼠海马 DG 区神经元凋亡的影响 (TUNEL,  $\times 400$ )

Fig. 2 Effects of daidzein on neuronal apoptosis in hippocampus DG area in mice model of depression (TUNEL,  $\times 400$ )

作用,能够促进神经细胞再生<sup>[9]</sup>;改善体外培养的海马神经细胞生存能力和增殖<sup>[10]</sup>;对 CNS 系统神经元在谷氨酸兴奋性中毒<sup>[11]</sup>和氧/葡萄糖剥夺模型中具有保护作用<sup>[12]</sup>。黄豆苷元与雌激素结构相似,被称为植物雌激素,植物雌激素对动物体内雌激素水平具有双向调节作用<sup>[13]</sup>,而动物雌激素具有抗抑郁作用<sup>[14]</sup>,本研究发现,黄豆苷元各剂量治疗组均可逆转因 CUMS 引起的小鼠抑郁行为学、海马 DG 区病理形态学异常,提示该药物具有潜在抗抑郁作用;TUNEL 法检测得动物给予黄豆苷元后神经细胞凋亡明显减少,提示黄豆苷元可能通过抑制神经细胞凋亡而发挥抗抑郁作用。至于黄豆苷元是如何对抗神经细胞凋亡,推测其机制可能涉及动物体内激素水平的变化和(或)凋亡信号转导通路变化,但具体机制及其相互关系有待于进一步探讨。

#### [参考文献]

- [1] 军事医学科学院. 军事医学科学院神经精神学研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2011, 41 (10): 884-889.
- [2] Thomas R M, Peterson D A. A neurogenic theory of depression gains momentum [J]. Mol Interv, 2003, 3 (8): 441-444.
- [3] Miller B R, Hen R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety [J]. Curr Opin Neurobiol, 2014, 9 (30): 51-58.
- [4] 周丽, 张永忠. 黄豆苷元神经保护作用研究进展 [J]. 食品科学, 2012, 33 (5): 281-284.
- [5] 付小彬, 缙灵山, 何冬梅, 等. 茶多酚改善慢性不可预知应激小鼠抑郁症状的作用 [J]. 茶叶科学, 2013, 33 (4): 301-305.

- [ 6 ] 王维刚,刘震泽,吴文婷,等. 旷场实验在小鼠行为分析中的应用[J]. 中国细胞生物学学报,2011,33(11):1191-1196.
- [ 7 ] Miller B R, Hen R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety [ J ]. Curr Opin Neurobiol, 2014,30(9):5158.
- [ 8 ] Miguel-Hidalgo J J, Whittom A, Villarreal A, et al. Apoptosis-related proteins and proliferation markers in the orbitofrontal cortex in major depressive disorder[J]. J Affect Disord,2014,158(4):62-70.
- [ 9 ] Matc, Campana A, Lange Ps, et al. A large-scale chemical screen for regulators of the arginase 1 promoter identifies the soy isoflavone daidzein as a clinically approved small molecule that can promote neuronal protection or regeneration via a cAMP-independent pathway[J]. J Neurosci,2010,30(2):739-748.
- [ 10 ] Pan M, Han H, Zhong C, et al. Effects of genistein and daidzein on hippocampus neuronal cell proliferation and BDNF expression in H19-7 neural cell line [ J ]. J Nutr Health Aging,2012,16(4):389-394.
- [ 11 ] Occhiuto F, Zangla G, Samperi S, et al. The phytoestrogenic isoflavones from *Trifolium pratense* L. (Red clover) protects human cortical neurons from glutamate toxicity [ J ]. Phytomedicine, 2008, 15 ( 9 ): 676-682.
- [ 12 ] Schreihofer D A, Redmod L. Soy phytoestrogens are neuroprotective against stroke-like injury *in vitro* [ J ]. Neuroscience,2009,158(2):602-609.
- [ 13 ] Roy C Y, Choi Judy T T Zhu, Amanda W Y Yung, et al. Synergistic action of flavonoids, baicalein, and daidzein in estrogenic and neuroprotective effects; a development of potential health products and therapeutic drugs against Alzheimer's disease [ J ]. Evid Based Complementary Alternat Med,2013,29(8):1-10.
- [ 14 ] Borrow A P, Cameron N M. Estrogenic mediation of serotonergic and neurotrophic systems; implications for female mood disorders [ J ]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,2014,54(10):13-25.

[责任编辑 聂淑琴]

## 欢迎订阅《中国中医药图书情报杂志》

本刊为国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的科技学术期刊,为中国中西医结合学会信息专业委员会、中国中医药信息研究会中医药信息数字化专业委员会的会刊。

本刊全面报道中医药图书情报方面的最新研究进展、科研教学成果,以及新技术、新方法在中医药图书情报领域的应用,促进中医药信息学学科的学术交流及人才培养,为中医药图书情报研究人员提供学术交流的平台。本刊已被《中国核心期刊(遴选)数据库》《中国学术期刊网络出版总库》《中国中医药期刊文献数据库》收录。

《中国中医药图书情报杂志》为双月刊,16开,62页,每册定价20元,全年120元。国内邮发代号:2-633,各地邮局订阅;国外代号:BM299,中国国际图书贸易集团有限公司(北京399信箱)订阅。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。

地址:北京市东直门内南小街16号 中国中医科学院中医药信息研究所《中国中医药图书情报杂志》编辑部,邮政编码:100700。

电话:010-64014411-3212

投稿网址: <http://tsqb.cintcm.com>

E-mail: [tsqb@mail.cintcm.ac.cn](mailto:tsqb@mail.cintcm.ac.cn)