

合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA3 区 BDNF 和 TrkB 表达的影响

施学丽¹, 杜正彩¹, 夏猛¹, 赵晓芳², 吴诚¹, 郭超峰^{3*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011;
3. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530032)

[摘要] 目的: 观察合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA3 区脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体酪氨酸激酶 B (TrkB)表达的影响。方法: 将 90 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、盐酸文拉法辛组(12.5 mg·kg⁻¹)、合欢花总黄酮(100, 50, 25 mg·kg⁻¹)剂量组。应用孤养加慢性不可预见性应激建立抑郁症模型, 造模同时 ig 给药, 每天 1 次, 连续给药 21 d, 正常组、模型组 ig 等体积蒸馏水。用 Morris 水迷宫法测定各组大鼠学习记忆能力, 免疫组织化学法检测大鼠海马 CA3 区 BDNF 及 TrkB 表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠 Morris 水迷宫试验逃避潜伏期时间增加、成功次数减少($P < 0.05$, $P < 0.01$); 海马 CA3 区 BDNF 及受体 TrkB 的表达降低($P < 0.01$)。与模型组比较, 盐酸文拉法辛组、合欢花总黄酮 3 个剂量组 Morris 水迷宫试验逃避潜伏期时间缩短、成功次数增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 海马 CA3 区 BDNF 及受体 TrkB 的表达明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 合欢花总黄酮能够提高抑郁模型大鼠学习记忆能力, 其作用机制可能与增加抑郁模型大鼠海马 CA3 区 BDNF 及其受体 TrkB 的表达, 进而保护海马神经元有关。

[关键词] 合欢花总黄酮; 抑郁症; 海马; 脑源性神经营养因子; 酪氨酸激酶 B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0198-04

[doi] 10.11653/syfy2013180198

Study on Antidepressant Effect of *Albizia julibrissin* Flower Total Flavonoids on the Expression of BDNF and TrkB in the Hippocampus CA3 of Rats with Depression

SHI Xue-li¹, DU Zheng-cai¹, XIA Meng¹, ZHAO Xiao-fang², WU Cheng¹, GUO Chao-feng^{3*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China;

3. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To research the effects of *Albizia julibrissin* flower total flavonoids (AJFTF) on the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosin kinase B (TrkB) in the hippocampus CA3 of rats with depression. **Method:** Ninety SD rats were randomly divided into normal group, model group, venlafaxine hydrochloride group (12.5 mg·kg⁻¹), and high, middle, low dosages of AJFTF groups (100, 50, 25 mg·kg⁻¹). Depression model rats were induced by solitary cultivation plus chronic stress. Rats in venlafaxine hydrochloride and AJFTF groups were orally administered with venlafaxine hydrochloride or AJFTF once daily for 21 days, and rats in normal and model groups with equal volume distilled water. The learning and memory ability of rats were determined by Morris maze method, and the expressions of BDNF and Trkb in hippocampal CA3 were

[收稿日期] 20130519(010)

[基金项目] 广西省自然科学基金项目(2011GXNSFB018095); 广西中医药大学校级课题(P2010002)

[第一作者] 施学丽, 硕士, 助理研究员, 从事中医药防治抑郁症的研究工作, Tel: 0771-3137535, E-mail: shi.lily@163.com

[通讯作者] * 郭超峰, 博士, 主管药师, 从事中药新药药效评价, Tel: 18776731534, E-mail: guochaofeng96@163.com

determined by immunohistochemical assay. **Result:** Compared with the normal group, escape latencies in model group were significantly increased and the times of succeed were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the expression of BDNF and TrkB in the hippocampus CA3 were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, escape latencies were significantly decreased and the times of succeed were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in venlafaxine hydrochloride group, AJFTF (100, 50, 25 mg · kg⁻¹) dosage groups, and the expression of BDNF and TrkB in the hippocampus CA3 was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** AJFTF can improve the learning and memory ability of rats with depression, and its mechanism may be related to the improvement of the expression of BDNF and TrkB in the hippocampus CA3 to protect the hippocampal neurons.

[**Key words**] *Albizia julibrissin* flower total flavonoids; depression; hippocampus; BDNF; TrkB

抑郁症是一组以情感障碍为突出表现的心理疾病,其发病与应激密切相关。随着人们工作和生活节奏的加快及各种应激因素的加剧,抑郁症的发病率正逐年上升。由于其发病会造成患者认知功能障碍,严重者甚至出现自杀,因此该病给社会和家庭带来了沉重的负担。由此针对其发病机制及治疗的研究亦逐渐引起研究者关注。

抑郁症的病理机制目前尚不完全清楚,但海马脑区损伤这一点已得到大家普遍认同。海马是大脑处理空间学习和记忆的关键区域,BDNF 及其高亲和力受体 TrkB 在海马中有较高的表达,对神经元的存活、分化、生长发育都起着重要的作用^[1],具有防止神经元损伤后死亡、改善神经元的病理状态、促进受损神经元再生及分化等方面发挥生物学效应,同时还具有抵抗伤害性刺激的作用^[2]。海马 CA3 区是一个对应激极度敏感的亚区,慢性应激导致海马 CA3 区锥体细胞功能降低、细胞存活能力受损^[3]。

作者课题组前期实验已经证实了合欢花有抗抑郁功效^[4],并且提示其抗抑郁成分可能是黄酮类物质^[5]。本研究以孤养加慢性不可预见性应激所致抑郁症建立模型。观察合欢花总黄酮对慢性应激抑郁模型大鼠学习记忆能力及海马 CA3 区 BDNF 及其受体 TrkB 表达的影响,以期阐释其抗抑郁机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康雄性 3 月龄 SD 大鼠,体重 (180 ± 20)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。许可证号 SCXK(湘)2009-0004。

1.2 药品与试剂 合欢花总黄酮(广西中医药大学中药化学教研室制,总黄酮含量约为 64%);盐酸文拉法辛胶囊(批号 20080601,苏州第四制药厂有限公司生产);BDNF 兔多克隆抗体(北京中衫公司)、TrkB 兔多克隆抗体(武汉博士德公司)、PV-6001 试剂盒(北京中衫公司)。

1.3 仪器 Microm HM355S 型全自动石蜡切片机(德国 MICROM 公司),CMIAS 系列多功能真彩病理图像分析系统(北京麦克奥迪图像技术有限公司),连续分液器(德国 Eppendorf 公司),Morris 水迷宫实验系统(北京现代太极电子有限公司),旷场实验箱(自制),Nikon D700 型单反照相机(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 大鼠适应性喂养 1 周后,用旷场实验^[6]作为行为学评分,3 min 内水平运动和垂直运动总分低于 30 分或高于 120 分的大鼠予以剔除。随机分为 6 组,即正常组、模型组、盐酸文拉法辛组(12.5 mg · kg⁻¹)、合欢花总黄酮(100, 50, 25 mg · kg⁻¹)剂量组。在造模的同时开始 ig 给药,每天 1 次,连续 21 d。正常组及模型组 ig 予以等体积的蒸馏水。

2.2 造模 除正常组普通喂养(群养)外,其余组参照文献^[7],制造为期 21 d 的大鼠孤养加慢性不可预见性应激抑郁模型。

2.3 学习记忆能力的检测 参照钟振国等^[8]的实验方法进行。实验第 17 天起采用 Morris 水迷宫测试仪进行检测,测试程序包括定位航行和空间搜索两个实验部分。水池上方的自动录像机同步记录大鼠的运动轨迹(黑白物)。

2.4 标本制备 在实验第 21 天,用 10% 水合氯醛麻醉实验大鼠,抗凝管腹主动脉取血,生理盐水冲洗后,继续灌注 4% 多聚甲醛,处死大鼠,取出大脑,将脑修块标记后置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h 以上。梯度乙醇脱水、透明,石蜡包埋后,冠状切片,片厚约 10 μL。用涂有明胶络明矾的载玻片捞片。

2.5 海马 CA3 区 BDNF 及受体 TrkB 的表达测定 免疫组织化学法测定,一抗为兔抗鼠 BDNF 多克隆抗体或兔抗鼠 TrkB 多克隆抗体,工作浓度均为 1:100;二抗为生物素化羊抗兔 IgG。PV-6001 试剂

盒。严格按试剂盒说明操作。对照实验:用 0.01 mol·L⁻¹ PBS 代替一抗,同步进行上述免疫组织化学染色,结果为阴性。

2.6 图像分析 采用 Motic Med 6.0 CMIAS 多功能真彩色细胞图像分析管理系统,对照大鼠脑立体定位图谱,每个指标选取每只动物相同部位的 3 张切片,在 200 倍光镜下计算海马 CA3 区的 BDNF 或 TrkB 阳性细胞数,取 3 张切片的平均值做为该动物海马 CA3 区的阳性细胞数。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析。所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行正态性检验,多个样本均数比较采用方差分析,组间多重比较采用 SNK-q 检验法。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对抑郁模型大鼠学习记忆能力影响 与正常组相比,模型组逃避潜伏期时间增加、成功次数减少 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组相比,各给药组逃避潜伏期时间缩短、成功次数增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (实验过程中,模型组动物死亡 2 只,盐酸文拉法辛组、合欢花总黄酮 50, 25 mg·kg⁻¹ 剂量组动物各死亡 1 只),见表 1。

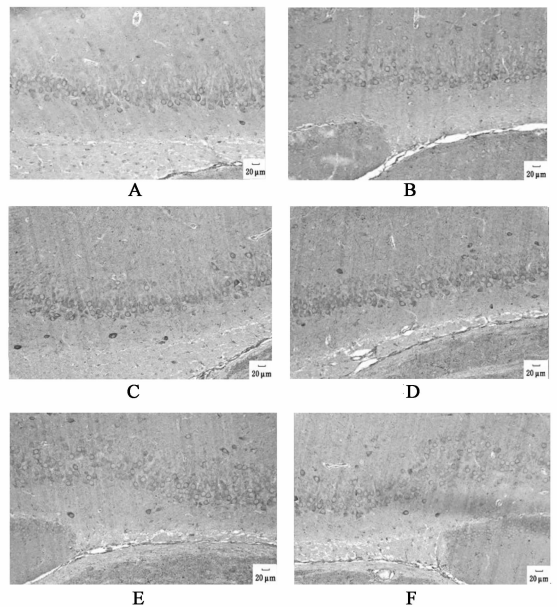
表 1 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹	学习记忆成绩	
			逃避潜伏期/s	成功数/次
正常	15	-	580 ± 99	5.80 ± 1.8
模型	13	-	825 ± 83 ¹⁾	3.14 ± 1.2 ²⁾
盐酸文拉法辛	14	12.5	658 ± 85 ³⁾	4.02 ± 2.1 ³⁾
合欢花总黄酮	15	100	590 ± 70 ³⁾	5.25 ± 1.5 ⁴⁾
	14	50	608 ± 75 ³⁾	4.85 ± 2.0 ⁴⁾
	14	25	645 ± 85 ³⁾	4.12 ± 2.3 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA3 区 BDNF 表达的影响 光镜下可见 BDNF 阳性细胞在海马区主要集中于 CA3 区锥体细胞,阳性反应存在于细胞胞浆中,呈黄褐色,胞核不染色。与正常组相比,模型组大鼠海马 CA3 区的 BDNF 免疫反应阳性神经元数目明显减少 ($P < 0.01$);与模型组相比,各给药组大鼠海马 CA3 区 BDNF 免疫反应阳性神经元数目明显增加 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见图 1 及表 2。

3.3 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA3 区 TrkB 表达的影响 光镜下可见 TrkB 的阳性细胞主要集中于海马神经元细胞中,阳性表达呈黄褐色,位于神经元细胞胞浆中,染色深浅不一,胞核不着色。



1. 正常组;2. 模型组;3. 盐酸文拉法辛 12.5 mg·kg⁻¹组;4. 合欢花总黄酮 100 mg·kg⁻¹组;5. 合欢花总黄酮 50 mg·kg⁻¹组;6. 合欢花总黄酮 25 mg·kg⁻¹组(图 2 同)

图 1 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA3 区 BDNF 表达的影响(免疫组化染色,×200)

与正常组比较,模型组大鼠海马 CA3 区 TrkB 阳性神经元表达弱,胞浆着色浅,数目明显减少,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组相比,各给药组大鼠海马 CA3 区 TrkB 免疫反应阳性神经元表达增强、颜色浓,数目明显增加,有显著意义 ($P < 0.01$)。见表 2 及图 2。

表 2 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA3 区 BDNF 和 TrkB 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹	BDNF 阳性	TrkB 阳性
			细胞数/个	细胞数/个
正常	15	-	75.3 ± 4.35	79.3 ± 4.23
模型	13	-	38.6 ± 5.21 ¹⁾	44.3 ± 4.22 ¹⁾
盐酸文拉法辛	14	12.5	55.6 ± 3.12 ³⁾	64.5 ± 4.92 ³⁾
合欢花总黄酮	15	100	58.8 ± 4.35 ³⁾	66.3 ± 5.77 ²⁾
	14	50	54.8 ± 2.33 ³⁾	60.2 ± 3.26 ²⁾
	14	25	49.3 ± 3.82 ²⁾	57.6 ± 3.29 ³⁾

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

4 讨论

抑郁症的发病机制尚未明确,在抑郁症发病机制的研究中发现 BDNF 的表达有重要意义。Martínez-Turrillas 认为 BDNF 表达水平的下降参与了抑郁症的某些病理生理过程,可能是抑郁症的基本病理改变之一,调节 BDNF 水平可能实现对抑郁症的治疗^[9]。长期抗抑郁药物(包括 MAO 抑制剂、

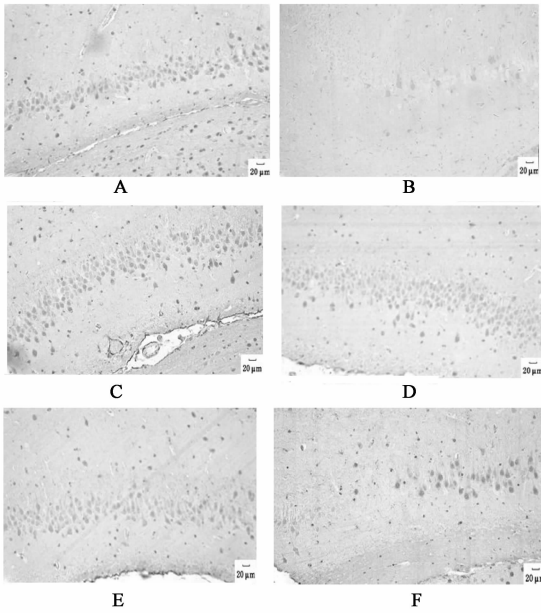


图2 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA3 区 TrkB 表达的影响(免疫组化染色, ×200)

选择性 5-HT 再摄取抑制剂、或选择性 5-HT/NA 再摄取抑制剂)治疗可提高成年人海马细胞的生存和齿状回细胞增殖及神经分化^[10]。有专家认为改良电抽搐抗抑郁机制可能是通过上调 BDNF 的表达,恢复神经元可塑性,促进神经元存活,从而缓解抑郁症状^[11]。大量研究证明,脑源性神经营养因子对多种类型的神经元具有分化、增殖、营养、成熟的作用。它能增强突触联系,影响神经元的可塑性和神经递质、神经营养因子的合成,且与长时增强效应及学习、记忆功能有关^[12-13]。

合欢花为豆科植物合欢 *Albizia julibrissin* Durazz. 的花序,具有解郁安神、理气和胃的功效,现代研究表明合欢花含有合欢苷、黄酮类化合物、鞣质等化学成分,具有调节中枢神经系统、抗抑郁的作用。同时,合欢花水煎液及醇提取物均能延长戊巴比妥钠睡眠时间、缓和紧张、减轻疲劳等药理作用^[14-16]。

本实验结果发现 21 d 慢性应激后抑郁模型大鼠海马 BDNF, TrkB 表达减少,其在海马 CA3 区减少尤为明显。合欢花高、中、低剂量组不同程度的提高大鼠海马 BDNF 及其受体 TrkB 的表达,并提高抑郁模型大鼠的学习记忆能力。表明慢性应激时大鼠海马 BDNF 及其受体 TrkB 的表达降低、学习记忆能力降低。合欢花总黄酮促进海马 BDNF 及其受体 TrkB 内源性表达,从而对海马神经元可塑性进行调节,保护海马神经元可能是其抗抑郁药理机制之一。

[参考文献]

- [1] Ferrer I, Ballabriga H, Marti E, et al. BDNF and TrkB colocalize in CA1 neurons resistant to transient forebrain ischemia in the adult gerbil [J]. *Neuropathol Exp Neurol*, 1997, 56(7):790.
- [2] Teng H K, Teng K K, Lee R, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin [J]. *Neurosci*, 2005, 25(22):5455.
- [3] 郑晖,马光瑜,许崇涛. 不同时段强迫游泳应激对大鼠空间学习记忆和海马神经元损伤的选择性作用[J]. *中国行为医学*, 2006, 15(11):976.
- [4] 蒋春雷,张永全,施学丽. 合欢花治疗抑郁症的临床研究[J]. *广西中医药*, 2012, 35(6):23.
- [5] 郭超峰,夏猛,银胜高,等. 合欢花总黄酮的抗抑郁作用及其机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(13):215.
- [7] 罗文舒,皮敏,饶晓丹,等. 针刺督脉和膀胱经促进抑郁症大鼠海马神经元再生的实验研究[J]. *广西中医药*, 2008, 31(4):46.
- [8] 钟振国,屈泽强,鲍运平,等. 三七总皂苷对 SD 大鼠空间探索学习记忆力的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2006, 29(1):34.
- [9] Martínez-Turrillas R, Del Río J, Frechilla D. Sequential changes in BDNF mRNA expression and synaptic levels of AMPA receptor subunits in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment [J]. *Neuropharmacology*, 2005, 49(8):1178.
- [10] Coppell A L, Pei Q, Zetterstrom T S. Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment [J]. *Neuropharmacology*, 2003, 44:903.
- [11] 胡永东,于欣,杨雨德,等. 改良电抽搐治疗对重度抑郁患者血清脑源性神经营养因子的影响[J]. *中国心理卫生杂志*, 2008, 22(2):98.
- [12] Seki M, Nawa H, Fukuchi T, et al. BDNF is upregulated by postnatal development and visual experience: quantitative and immunohisto-chemical analyses of BDNF in the rat retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44:3211.
- [13] Russo-neustadt A A, Chen M J. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(12):1495.
- [14] 付超美,王佛华,刘久弟,等. 合欢皮水煎剂催眠作用的药理实验研究[J]. *河北医科大学学报*, 2002, 15(4):321.
- [15] 康健. 合欢花总黄酮提取工艺的研究[J]. *中成药*, 2004, 25(3):19.
- [16] 李作平,张媚丽,刘维娜,等. 合欢花化学成分的研究(II) [J]. *天然产物研究与开发*, 2005, 17(5):58.

[责任编辑 聂淑琴]