

# 合欢花总黄酮的抗抑郁作用及其机制研究

郭超峰<sup>1</sup>, 夏猛<sup>2</sup>, 银胜高<sup>2</sup>, 施学丽<sup>2\*</sup>

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530032; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001)

**[摘要]** **目的:**研究合欢花总黄酮的抗抑郁作用,并初步探讨其抗抑郁作用机制。**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(0.012 5 g·kg<sup>-1</sup>)、合欢花总黄酮(0.10, 0.05, 0.025 g·kg<sup>-1</sup>)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。用旷场实验法测定各组大鼠行为变化,TUNEL 原位杂交检测海马 CA3 区神经元细胞凋亡。**结果:**与正常组比较:模型组大鼠旷场实验 3 min 内水平运动、垂直运动得分均明显降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),海马 CA3 区神经元凋亡细胞数、阳性细胞率均显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较:盐酸文拉法辛组、合欢花总黄酮(0.10, 0.05, 0.025 g·kg<sup>-1</sup>)剂量组旷场实验 3 min 内水平运动、垂直运动得分均明显增高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),海马 CA3 区神经元凋亡细胞数及阳性细胞率均明显减少( $P < 0.05$ )。**结论:**合欢花总黄酮具有抗抑郁作用,其机制可能与拮抗 CA3 区海马神经元细胞凋亡有关。

**[关键词]** 合欢花总黄酮; 抑郁症; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0225-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013130225

## Antidepressant Effect by Albizzia Julibrissin Flower Total Flavonoids and its Mechanism

GUO Chao-feng<sup>1</sup>, XIA Meng<sup>2</sup>, YIN Sheng-gao<sup>2</sup>, SHI Xue-li<sup>2\*</sup>

(1. First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530032, China;

**[收稿日期]** 20121209(008)

**[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]** 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

**[通讯作者]** \* 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

- [ 3 ] 王本祥, 马金凯, 邓文龙, 等. 现代中药药理学 [M]. 天津:天津科学技术出版社, 1999:349.
- [ 4 ] 胡艳萍, 王骏业. 紫草素增加小鼠肝癌和 Lewis 肺癌治疗效应的初步研究[J]. 肿瘤防治研究, 1991, 18 (2):71.
- [ 5 ] Hsieh T J, Liu T Z, Chia Y C, et al. Protective effect of methyl gallate from toona sinensis (meliaceae) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells [J]. Food Chem Toxicol, 2004 (42):843.
- [ 6 ] 郑作文, 吕林艳, 王小琴, 等. 蛇葡萄素诱导人胃癌细胞凋亡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (24):292.
- [ 7 ] Circu M L, Rodriguez C, Maloney R, et al. Contribution of mitochondrial GSH transport to matrix GSH status and colonic epithelial cell apoptosis [J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44:768.
- [ 8 ] Okouchi M, Okayama N, Alexander J S, et al. NRF2-dependent glutamate-L-cysteine ligase catalytic subunit expression mediates insulin protection against hyperglycemia-induced brain endothelial cell apoptosis [J]. Curr Neurovasc Res, 2006(3):249.
- [ 9 ] Schafer F Q, Buettner G R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple [J]. Free Radic Biol Med, 2001, 30:1191.
- [ 10 ] 李晓龙, 吴育郎, 林子群, 等. 绞股蓝总皂苷对人肝癌细胞 Bel-7402 增殖与凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (19):238.

[责任编辑 聂淑琴]

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the antidepressant effects of Albizzia Julibrissin Flower total flavonoids (AJFTF) and explore its mechanism preliminarily. **Method:** Ninety SD rats were randomly divided into normal group, model group, venlafaxine hydrochloride group ( $0.0125 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and high, middle, low dosages of AJFTF groups ( $0.10, 0.05, 0.025 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). 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 behavior changes were determined by open field test, and the behavior and hippocampal CA3 neurons apoptosis were determined by TUNEL assay. **Result:** Compared with the normal group, horizontal movements and vertical movements scores in 3 min of open field test in model group were significantly lower ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the numbers of apoptotic and positive cells in hippocampal CA3 region were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, 3 min horizontal movements and vertical movements scores of open field test in venlafaxine hydrochloride group, AJFTF ( $0.10, 0.05, 0.025 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) dosage groups were significantly higher ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the numbers of apoptotic and positive cells in hippocampal CA3 region were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** AJFTF has antidepressant effects, and its mechanism may be related to antagonizing the hippocampal neurons apoptosis of CA3 region.

**[Key words]** Albizzia Julibrissin Flower total flavonoids (AJFTF); depression; apoptosis

抑郁症是一种包括多种精神症状和躯体症状的复杂的情感性精神障碍,其发病率和自杀率高,危害性大,已成为社会和医学界广为关注的问题<sup>[1]</sup>。合欢花为豆科植物合欢(*Albizzia julibrissin* Durazz.)的花序。其性平,味甘,具有解郁安神、理气和胃的功效。研究已经证实合欢花有抗抑郁功效<sup>[2-3]</sup>,并且提示其抗抑郁成分可能是黄酮类物质<sup>[4]</sup>。本实验以孤养加慢性不可预见性应激所致抑郁症模型大鼠为研究对象,观察合欢花总黄酮对抑郁症模型大鼠行为学影响,并检测与抑郁症发病密切相关的海马 CA3 区神经元细胞凋亡的情况,研究合欢花总黄酮抗抑郁的作用机制,为临床治疗抑郁症提供参考依据。

### 1 材料

**1.1 动物** 清洁级健康雄性 3 月龄 SD 大鼠,体重 ( $180 \pm 20$ )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);TUNEL 检测试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

**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);旷场实验箱(自制)。

### 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<sup>[5]</sup>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( $0.0125 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、合欢花总黄酮( $0.10, 0.05, 0.025 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )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[6],包括 24 h 禁食,24 h 禁水,通宵照明,4 ℃冷水游泳 5 min,45 ℃烘箱热烘 5 min,夹尾 1 min,高速水平振荡 3 min,100 V 电击足底 1 min(电击延迟 1 s),悬尾 1 min 等 9 种刺激,21 d 内随机安排,每天给予 1 种刺激,每种刺激出现 2~3 次,同一种刺激不能连续出现,使动物不能预知给予的刺激。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 大鼠行为学试验** 参考文献方法[5]制作敞箱,记录大鼠在 3 min 内的活动。以穿越底面格数为水平运动得分(记录四爪均进入的方格),以两前肢离开底面直立次数为垂直运动得分,每只大鼠只测 1 次,实验在第 21 天晚上进行。每次实验后需将

动物排泄物清除干净,再进行下一只大鼠的观察。

**2.4 标本制备** 在实验第 21 天旷场行为学后,抗凝管腹主动脉取血,快速注射生理盐水,继续灌注 4% 多聚甲醛,脱臼处死大鼠,取出大脑,将脑组织块标记后置于 4% 多聚甲醛溶液中后固定 48 h 以上。梯度酒精脱水、透明,石蜡包埋后,冠状切片,10  $\mu\text{m}$  片厚连续切片。

**2.5 海马 CA3 区神经元细胞凋亡的测定** 采用末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 介导的 d-UTP 缺口末端标记技术 (TUNEL) 染色,严格按试剂盒说明书进行操作。

**2.6 图像分析** 光镜下,TUNEL 染色细胞核中含有棕黄色颗粒者为阳性细胞,每只动物各取相同部位 3 张切片,在同一放大倍数 (40  $\times$  10)、同一光强度下,采用 CMIAS 多功能真彩色病理图像分析系统,计数每张切片中海马 CA3 区神经元细胞凋亡个数,以 3 张切片的均值作为该只动物海马 CA3 区神经元细胞凋亡个数。同样方法计数该只动物海马 CA3 区神经元细胞总数,并计算阳性细胞率。

$$\text{阳性细胞率} = \text{阳性细胞数} / \text{细胞总数} \times 100\%$$

**2.7 统计学方法** 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 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠行为学影响** 与正常组相比,模型组大鼠水平运动、垂直运动得分均降低 ( $P < 0.05$ );与模型组相比,各给药组水平运动、垂直运动得分增高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与盐酸文拉法辛组相比,合欢花总黄酮 (0.10, 0.05  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 剂量组水平运动、垂直运动得分增高 ( $P < 0.05$ ) (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 (0.05, 0.025  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 剂量组动物各死亡 1 只)。详见表 1。

表 1 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠行为学的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ) 分

组别	n	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	行为学成绩	
			水平运动	垂直运动
正常	15	-	45.6 $\pm$ 9.2	13.5 $\pm$ 1.8
模型	13	-	32.1 $\pm$ 7.2 <sup>1)</sup>	6.8 $\pm$ 3.3 <sup>2)</sup>
盐酸文拉法辛	14	0.012 5	44.2 $\pm$ 8.3 <sup>3)</sup>	12.0 $\pm$ 2.1 <sup>3)</sup>
合欢花总黄酮	15	0.10	42.5 $\pm$ 7.5 <sup>3,5)</sup>	13.2 $\pm$ 2.5 <sup>4,5)</sup>
	14	0.05	41.3 $\pm$ 8.6 <sup>3,5)</sup>	11.5 $\pm$ 1.8 <sup>4,5)</sup>
	14	0.025	38.2 $\pm$ 6.3 <sup>4)</sup>	8.2 $\pm$ 2.0 <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>  $P < 0.01$ ;与盐酸文拉法辛组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.2 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA3 区神经元细胞凋亡的影响** 光镜下可见凋亡细胞细胞核深染为棕黄色,非凋亡细胞则呈蓝色。与正常组比较,模型组大鼠海马 CA3 区神经元凋亡细胞数、阳性细胞率均显著增加 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,合欢花总黄酮 (0.10, 0.05, 0.025  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 剂量组及盐酸文拉法辛组大鼠海马 CA3 区神经元凋亡细胞数、阳性细胞率均减少 ( $P < 0.05$ );与盐酸文拉法辛组相比,合欢花总黄酮 (0.10, 0.05, 0.025  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 剂量组大鼠海马 CA3 区神经元凋亡细胞数、阳性细胞率无显著变化。详见表 2。

表 2 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA3 区神经元凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	阳性细胞 数/个	阳性细胞率 /%
正常	15	-	7.12 $\pm$ 1.36	5.33 $\pm$ 6.85
模型	13	-	18.23 $\pm$ 1.62 <sup>1)</sup>	25.45 $\pm$ 3.62 <sup>1)</sup>
盐酸文拉法辛	14	0.012 5	11.28 $\pm$ 1.06 <sup>2)</sup>	8.38 $\pm$ 3.23 <sup>2)</sup>
合欢花总黄酮	15	0.10	10.23 $\pm$ 2.06 <sup>2)</sup>	9.11 $\pm$ 4.35 <sup>2)</sup>
	14	0.05	11.12 $\pm$ 2.38 <sup>2)</sup>	10.31 $\pm$ 6.44 <sup>2)</sup>
	14	0.025	9.56 $\pm$ 1.33 <sup>2)</sup>	10.44 $\pm$ 5.51 <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>  $P < 0.05$ 。

### 4 讨论

随着现代生活节奏加快,各种应激因素加剧,使严重危害人类身心健康的精神疾病-抑郁症的患病率逐年上升,引起国际上的普遍关注。迄今为止,抑郁症的发病机制尚不明确。应激性生活事件是恶劣心境障碍等抑郁发作疾病的明显促发因素<sup>[7]</sup>。本实验采用目前国内外公认的孤养加慢性不可预见性应激建立抑郁模型,结果发现抑郁模型大鼠旷场实验中的水平运动及垂直运动得分均降低。说明动物出现了精神运动迟滞和兴趣丧失症状,这与抑郁症的情绪低落及兴趣丧失的核心症状有一定程度的相似性,表明本实验大鼠抑郁症模型制作是成功的。经抗抑郁治疗后,合欢花总黄酮各剂量组大鼠水平运动、垂直运动得分增高,证明合欢花总黄酮具有抗抑郁功效。

凋亡是细胞损伤的主要形式之一<sup>[8]</sup>,与抑郁症发生密切相关<sup>[9]</sup>。本实验结果表明模型组大鼠海马 CA3 区在 21 d 的慢性应激后神经元凋亡细胞计数及阳性细胞率增加,表明孤养加慢性不可预见性应激可以增加海马 CA3 区神经元细胞凋亡。提示合欢花总黄酮可能是通过拮抗大鼠海马 CA3 区神

经元细胞凋亡,从而发挥抗抑郁的作用。

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 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<sup>[10]</sup>。应激对细胞凋亡和神经再生的损害可以通过抗抑郁药物缓解<sup>[11-12]</sup>。本实验也观察到模型组大鼠海马 CA3 区神经元凋亡细胞增加、阳性细胞率增高,合欢花总黄酮能够降低海马 CA3 区神经元凋亡细胞数及阳性细胞率。

本实验结果表明合欢花总黄酮可以改善抑郁模型大鼠抑郁行为,具有抗抑郁功效,其作用机制可能与拮抗海马 CA3 区神经元凋亡有关。但对于合欢花总黄酮影响海马 CA3 区神经元凋亡的精细机制和与此相关的调控因子还有待于进一步的研究和证实,从而为临床抗抑郁新药的开发提供依据。

#### [参考文献]

[1] Kessler R C, Berglund P, Demler O, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication [J]. JAMA, 2003, 289(23):3095.

[2] 李作平,赵丁,任雷鸣,等.合欢花抗抑郁作用的药理实验研究初探[J].河北医科大学学报,2003,24(4):214.

[3] 向春,严铸云,李晓华,等.5种川产合欢花抗抑郁作用比较研究[J].时珍国医国药,2006,17(7):1168.

[4] 李作平,张婊丽,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.

[5] 贾宝辉,李志刚,卢峻,等.电针抗抑郁研究的模型探讨[J].针刺研究,2005,30(1):22.

[6] 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.

[7] 谢忠礼,李杰,王兴华.加味四逆散对慢性应激模型大鼠下丘脑单胺类神经递质的影响[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(1):50.

[8] 樊蔚虹,姚建平,杨清,等.柴胡疏肝散干预卒中后抑郁模型大鼠海马神经细胞凋亡的机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(22):216.

[9] 吕莹,张德禄,张宏,等.细胞凋亡检测方法研究进展[J].西北师范大学学报:自然科学版,2007,43(2):82.

[10] 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.

[11] Bielecka A M, Obuchowicz E. Antiapoptotic action of lithium and valproate [J]. Pharmacol Rep, 2008, 60(6):771.

[12] Tazik S, Johnson S, Lu D, et al. Comparative neuroprotective effects of rasagiline and aminoindan with selegiline on dexamethasone-induced brain cell apoptosis [J]. Neurotox Res, 2009, 15(3):284.

[责任编辑 聂淑琴]

## 《中国中药杂志》2013 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2013 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 [www.cjcm.com.cn](http://www.cjcm.com.cn) 或 [www.中国中药杂志.com](http://www.中国中药杂志.com)。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。