

· 药效与毒理学研究 ·

合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA1 区 BDNF 和 TrkB 表达的影响

施学丽(广西中医药大学, 广西 南宁 530001)

摘要: 目的 观察合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA1 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 大鼠随机分为正常对照组, 模型组, 盐酸文拉法辛组($12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 合欢花总黄酮高、中、低剂量组($100, 50, 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。以孤养加慢性不可预见性应激方法复制大鼠抑郁模型。采用旷场实验法测定各组大鼠的行为变化, 免疫组织化学法检测大鼠海马 CA1 区 BDNF 及 TrkB 表达。结果 与正常对照组比较, 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减少($P < 0.05, P < 0.01$), 海马 CA1 区 BDNF 及受体 TrkB 的表达降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组水平运动得分和垂直运动得分都明显增加($P < 0.05$); 海马 CA1 区 BDNF 及受体 TrkB 的表达明显增加($P < 0.05, P < 0.01$)。结论 合欢花总黄酮可以改善抑郁模型大鼠的抑郁行为, 具有抗抑郁功效, 其作用机制可能与增加海马 CA1 区 BDNF 及其受体 TrkB 的表达, 从而保护海马神经元有关。

关键词: 合欢花总黄酮; 抑郁症; 脑源性神经营养因子; 酪氨酸激酶 B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)01-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.01.001

Effect of Flos Albizziae Total Flavonoids on Expression of BDNF and TrkB in the Hippocampus CA1 of Rat Depression Model

SHI Xueli(Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001 Guangxi, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Flos Albizziae total flavonoids(FATF) on the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor tyrosine kinase B(TrkB) in the hippocampus CA1 of rats with depression. **Methods** Ninety SD rats were randomly divided into normal group, model group, Venlafaxine Hydrochloride group($12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and high-, middle-, low-dosage FATF groups($100, 50, 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively). Depression rat model was established by solitary cultivation plus unpredictable chronic stress. Rats in Venlafaxine Hydrochloride group and FATF groups were orally administered with Venlafaxine Hydrochloride or FATF once daily for 21 days, and rats in normal group and model group were given equal volume of distilled water. The behavior scores were evaluated by open field test, and the expression of BDNF and Trkb in hippocampal CA1 was detected by immunohistochemical assay. **Results** Compared with the normal group, the behavior scores in the model group were decreased significantly($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the expression of BDNF and TrkB in the hippocampal CA1 was significantly decreased($P < 0.01$). Compared with the model group, the behavior scores were increased($P < 0.05$) in Venlafaxine Hydrochloride group and FATF groups, and the expression of BDNF and TrkB in the hippocampal CA1 was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** FATF can improve the behavior of rats with depression, having antidepressant effect, and its mechanism in protecting hippocampus neurons may be related to the improvement of the expression of BDNF and TrkB in the hippocampal CA1.

Keywords: Flos Albizziae total flavonoids(FATF); Depression; 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。脑源性神经营养因子

(BDNF) 及其高亲和力功能受体酪氨酸激酶 B(TrkB) 在海马中有较高的表达, 对神经元的存活、分化、生

收稿日期: 2013-07-22

通讯作者: 施学丽, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 中医药防治抑郁症。Email: shi.lily@163.com。

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(2011GXNSFB018095); 广西中医药大学校级课题(P2010002)。

长发育都起着重要的作用^[1],可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,同时还具有对抗伤害性刺激的作用^[2]。合欢花为豆科植物合欢 *Albizia julibrissin* Durazz.的花序,前期研究^[3-5]已经证实合欢花有抗抑郁功效,并且提示其抗抑郁成分可能是黄酮类物质。本研究以孤养加慢性不可预见性应激方法复制大鼠抑郁症模型,观察合欢花总黄酮对慢性应激抑郁模型大鼠海马 CA1 区 BDNF 及其受体 TrkB 表达的影响,以期阐释其抗抑郁机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级雄性 3 月龄 SD 大鼠,体质量(180±20) g,湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2009-0004。

1.2 药物及试剂 合欢花总黄酮由本校中化教研室提供,纯度大于 50%,临用时用蒸馏水配制;盐酸文拉法辛胶囊,苏州第四制药厂有限公司,批号:20080601;BDNF 兔多克隆抗体,北京中衫公司,批号:13604L03;TrkB 兔多克隆抗体,武汉博士德公司,批号:10CM172;PV-6001 试剂盒,北京中衫公司,批号:K60854B。

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;Nikon D700 型单反照相机,日本尼康公司。

1.4 动物模型复制 参照文献方法^[6],以禁食 24 h,禁水 24 h,通宵照明,夹尾 1 min,4℃冷水游泳 5 min 等 9 种刺激,21 d 内随机安排,每天给予 1 种刺激,同一种刺激不能连续出现,使动物不能预见给予的刺激,每种刺激出现 2~3 次。

1.5 分组及给药方法 大鼠适应性喂养 1 周后,用旷场实验^[7]作行为学评分,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。将筛选出的 90 只大鼠,按随机数字表法分为 6 组,即正常对照组,模型组,盐酸文拉法辛组(12.5 mg·kg⁻¹)、合欢花总黄酮高、中、低剂量组(100, 50, 25 mg·kg⁻¹,分别相当于合欢花生药量 10, 5, 2.5 g·kg⁻¹,成人临床剂量的 20, 10, 5 倍),每天灌胃给药 1 次,连续 21 d。正常对照组及模型组给予等容积的蒸馏水。

1.6 大鼠行为学试验 参考文献方法^[7]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 4 爪均进入的方格数),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。

1.7 免疫组织化学法测定海马 CA1 区 BDNF 及受体 TrkB 的表达

在第 21 天旷场行为学实验后,抗凝管腹主动脉取血,生理盐水冲洗后,灌注 4%多聚甲醛,然后颈椎脱臼处死大鼠,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。梯度酒精脱水、透明,石蜡包埋,冠状切片,片厚约 10 μL。用涂有明胶络明矾的载玻片捞片。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。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。采用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 CA1 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 CA1 区的阳性细胞数。

1.8 统计学处理方法 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠行为学的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠水平运动、垂直运动得分均明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,各给药组水平运动、垂直运动得分明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 1。

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

Table 1 Behavior scores of the rats in different groups

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹	行为学得分	
			水平运动得分	垂直运动得分
正常对照组	15		45.6 ± 9.2*	13.5 ± 1.8**
模型组	13		32.1 ± 7.2	6.8 ± 3.3
盐酸文拉法辛组	14	12.5	44.2 ± 8.3**	12.0 ± 2.1**
合欢花总黄酮高剂量组	15	100	42.5 ± 7.5**	13.2 ± 2.5**
合欢花总黄酮中剂量组	14	50	41.3 ± 8.6**	11.5 ± 1.8**
合欢花总黄酮低剂量组	14	25	38.2 ± 6.3*	8.2 ± 2.0*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2.2 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA1 区 BDNF 表达的影响

光镜下可见正常对照组海马 CA1 区均匀分布大量 BDNF 免疫标记阳性神经元,呈黄褐色,排列整齐紧密,核仁清晰,阳性表达细胞多,形态正常;模型组海马 CA1 区 BDNF 免疫标记阳性神经元数目明显减少,排列紊乱,色较浅,部分神经元胞浆有空化现象,或胞体缩小,甚至固缩;盐酸文拉法辛组及合欢花总黄酮高、中、低剂量组海马 CA1 区 BDNF 免疫标记阳性神经元形态未见明显异常,呈棕

黄色，排列整齐紧密，核仁清晰，阳性表达细胞较模型组增多，见图 1。

与正常对照组比较，模型组大鼠海马 CA1 区的 BDNF 免疫反应阳性神经元数目明显减少，差异有统

计学意义($P < 0.01$)；与模型组比较，盐酸文拉法辛组及合欢花总黄酮高、中、低剂量组大鼠海马 CA1 区 BDNF 免疫反应阳性神经元数目明显增加，差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 2。

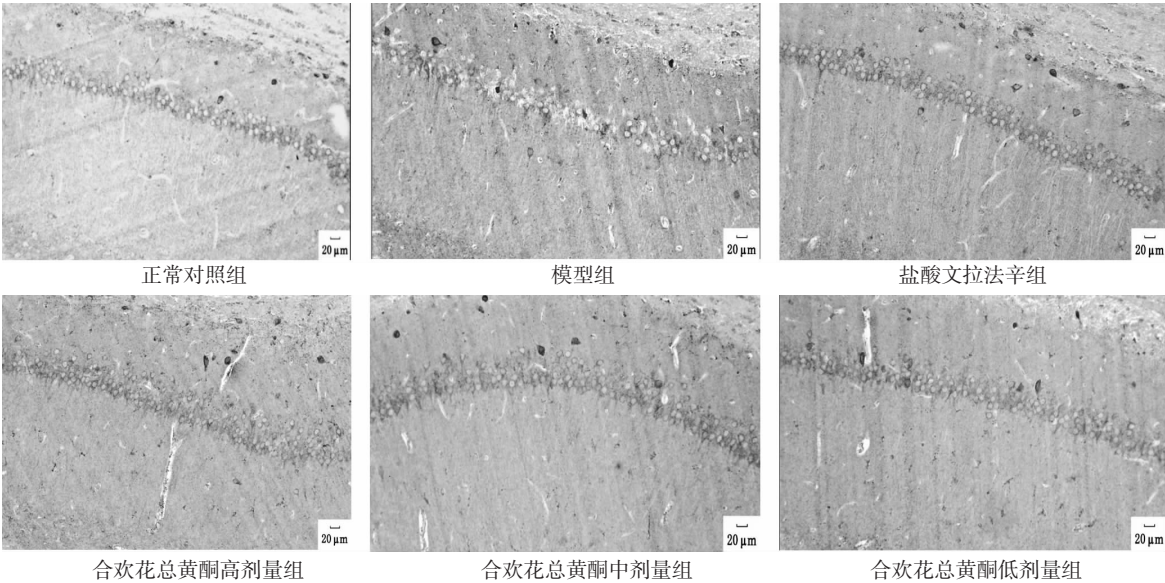


图 1 各组大鼠海马 CA1 区 BDNF 染色(免疫组化法, ×200 倍)

Figure 1 The expressions of BDNF in hippocampal CA1 of rats in different groups(immunohistochemical method, ×200)

表 2 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA1 区 BDNF 及 TrkB 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The expressions of BDNF and TrkB in hippocampal CA1 of rats in different groups

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹	阳性细胞数	
			BDNF	TrkB
正常对照组	15	—	67.4±3.53**	70.5±2.25**
模型组	13	—	32.1±4.33	35.4 ±3.26
盐酸文拉法辛组	14	12.5	49.1±2.34**	57.2±3.41**
合欢花总黄酮高剂量组	15	100	52.3±3.12**	60.5±4.14**
合欢花总黄酮中剂量组	14	50	48.5±3.42**	55.3±3.19*
合欢花总黄酮低剂量组	14	25	44.2±3.14*	48.3±4.12*

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

2.3 合欢花总黄酮对抑郁模型大鼠海马 CA1 区 TrkB

表达的影响 光镜下可见正常对照组海马 CA1 区均匀分布大量 TrkB 免疫标记阳性神经元，呈棕黄色，排列整齐紧密，阳性表达细胞多，形态正常。模型组海马 CA1 区 TrkB 免疫标记阳性神经元数目明显减少，排列相对紊乱，色较浅，部分神经元胞浆有空化现象，或胞体缩小，甚至固缩。盐酸文拉法辛组，合欢花总黄酮高、中、低剂量组海马 CA1 区 TrkB 免疫标记阳性神经元形态未见明显异常，呈浅棕黄色，排列比较整齐紧密，阳性表达细胞较模型组增多，见图 2。

与正常对照组比较，模型组大鼠海马 CA1 区 TrkB 阳性神经元表达数目明显减少，差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较，盐酸文拉法辛组及

合欢花总黄酮高、中、低剂量组大鼠海马 CA1 区 TrkB 免疫反应阳性神经元表达数目明显增加，差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)，见表 2。

3 讨论

本研究结果表明，抑郁症模型大鼠行为学表现为水平运动和垂直运动得分明显降低，水平运动减少反映了动物活动度的降低，垂直运动减少反映了动物对新鲜环境的好奇程度降低。模型大鼠表现出的抑郁状态、活动能力下降、兴趣丧失与抑郁症临床表现相似，且这种抑郁状态可保持较长时间，是较理想的抑郁动物模型。合欢花总黄酮各剂量组大鼠水平运动和垂直运动得分明显增加，显示合欢花总黄酮具有较好的抗抑郁作用。

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 的表达变化有重要意义。大量研究^[8]表明，BDNF 表达下调可能参与慢性应激抑郁症时海马结构和功能的改变。心理以及物理应激能下调海马 BDNF mRNA 表达，提示与应激相关的抑郁症与海马 BDNF 有密切联系。BDNF 与中枢神经系统神经元的存活以及多巴胺能、胆碱能、5-羟色胺能神经元的可塑性密切相关^[9]。BDNF 参与抑郁症的发病机制可能与一氧化氮(NO)有关，NO 参与慢性应激下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)轴持续激活导致糖皮质激素高分泌的过程，而应激时糖皮质激素释放增

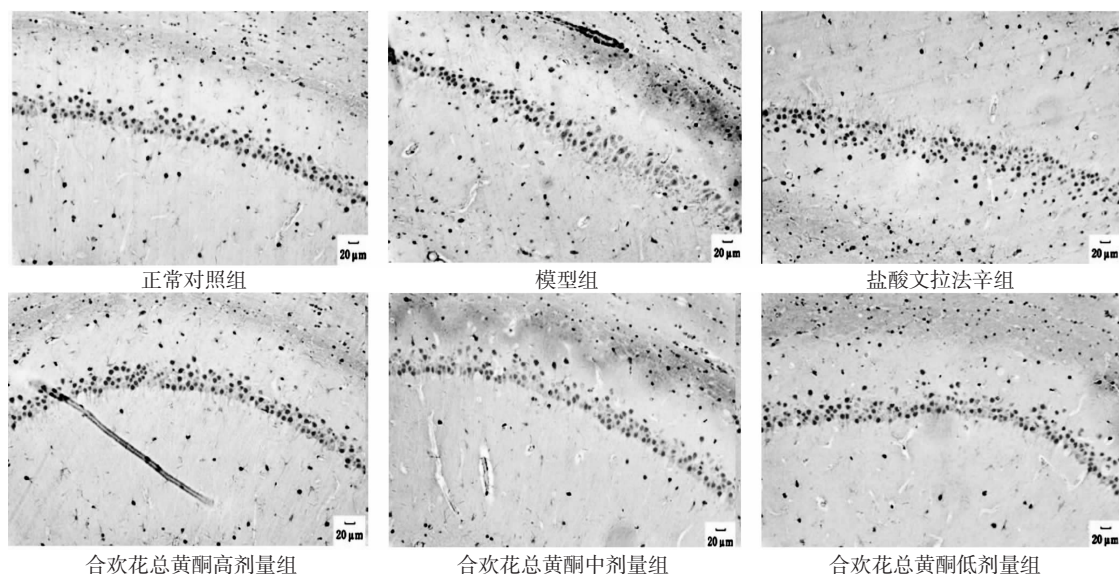


图2 各组大鼠海马CA1区TrkB染色(免疫组化, ×200倍)

Figure 2 The expressions of TrkB in hippocampal CA1 of rats in different groups (immunohistochemical method, ×200)

加又部分介导应激时 BDNF 表达减少^[10]。BDNF 还可能通过对 D3 受体基因的表达调控, 对神经元的增殖、分化和存活发挥作用, 在神经精神疾病中起作用^[11]。有学者^[12]认为 BDNF 参与了抑郁症的某些病理生理过程, BDNF 变化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。有专家^[13]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。

TrkB、BDNF 是所有神经营养因子中唯一一对在时间和空间上协同表达的受体配体复合物。当 BDNF 与 TrkB 结合时, 受体分子二聚化, 其多个氨基酸残基快速自动磷酸化, 磷酸化的转录因子移入细胞核并与特定基因的启动子区结合启动转录过程^[14]。BDNF 与 TrkB 结合后对损伤的神经元有明显的保护作用^[15]。

本实验结果显示, 模型组大鼠海马 BDNF 及其受体 TrkB 的表达明显下降, 合欢花总黄酮各剂量组能不同程度地提高大鼠海马 BDNF 及其受体 TrkB 的表达。提高海马 BDNF 及其受体 TrkB 的表达, 进而对海马神经元可塑性进行调节, 保护海马神经元可能是合欢花总黄酮的抗抑郁药理机制之一。具体机制还有待进一步研究。

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 HK, Teng KK, Lee R, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin[J]. Neurosci, 2005, 25(22): 5455-5463.
- [3] 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): 23-25.
- [4] 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): 215-219.
- [5] 李作平, 张曼丽, 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.
- [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): 46-48.
- [7] 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): 22-25.
- [8] 彭桂军. 脑源性神经营养因子与抑郁症的研究进展[J]. 国外医学(精神病学分册), 2004, 31(3): 152-154.
- [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] 胡永东, 于欣, 杨甫德, 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.
- [11] Malberg JE, Elsch AJ, Nestler EJ, et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus[J]. Neurosci, 2000, 20(24): 9104-9110.
- [12] Angelucci F, Aloe L, Jiménez-Vasquez P, et al. Electroconvulsive stimuli alter nerve depression[J]. Neuropeptides, 2003, 37(1): 51-56.
- [13] Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system[J]. Nature, 2000, 407: 802-809.
- [14] Garzon D, Yu G, Fahnestock M. A new brain-derived neurotrophic factor transcript and decrease in brain-derived neurotrophic factor transcript 1, 2 and 3 in Alzheimer's disease parietal cortex[J]. J Neurochem, 2002, 82(5): 1058-1064.
- [15] Miyata K, Omori N, Uchion H, et al. Involvement of the brain-derived neurotrophic factor/TrkB pathway in neuroprotective effect of cyclosporin A in forebrain ischemia[J]. Neuroscience, 2001, 105(3): 571-578.

(编辑: 梁进权)