

· 研究论文 ·

黄蜀葵花中黄酮类化合物抗抑郁活性及其上调大鼠海马组织中 BDNF 的作用机制研究

蔡红蝶¹, 陶伟伟^{1,2}, 宿树兰^{1*}, 郭盛¹, 朱悦¹, 郭建明¹,
钱大玮¹, 丛旭东³, 唐仁茂³, 段金廛^{1*}

(1. 南京中医药大学, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 国家中医药管理局中药资源循环利用重点实验室, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学, 平移系统生物学与神经科学中心/脑疾病综合生物医学实验室, 基础医学院, 江苏 南京 210023; 3. 江苏苏中药业集团制药有限公司, 江苏 姜堰 225500)

摘要: 黄蜀葵花为中国民间草药, 是锦葵科秋葵属黄蜀葵 [*Abelmoschus manihot* (L.) Medic.] 的干燥花冠, 已报道其具有抗抑郁活性。本文从黄蜀葵花中分离纯化得到主要黄酮类化合物, 并探索其中 5 种化合物抗抑郁活性及其作用机制。采用 D101 大孔树脂柱、聚酰胺柱和 SephadexLH-20 柱对黄酮类成分进行分离与纯化, 经 UHPLC 与 NMR 等技术鉴定, 得到 8 个黄酮类化合物, 为杨梅素-3-O-β-D-葡萄糖苷 (1)、棉皮素-8-O-β-D-葡萄糖苷 (2, G-8-G)、棉皮素-3'-O-β-D-葡萄糖苷 (3)、槲皮素-3'-葡萄糖苷 (4, Q-3-G)、异槲皮苷 (5, IQT)、金丝桃苷 (6, HY)、杨梅黄酮 (7) 和槲皮素 (8, QT)。采用小鼠分别灌胃化合物 2、4、5、6 和 8 (15、30、60 mg·kg⁻¹) 24 h 后, 观察悬尾实验 (tail suspension test, TST) 和强迫游泳实验 (forced swimming test, FST), 并采用 Western blot 技术检测小鼠海马组织中脑源性神经营养因子 (BDNF)、酪氨酸受体激酶 B (TrkB) 和磷酸化的真核延伸因子 2 (p-eEF2) 的表达。结果表明, 化合物 2 和 4 能够显著缩短小鼠在 FST 和 TST 中的不动时间, 显著增加 BDNF 和 TrkB 的表达, 减少 p-eEF2 的表达。可见, 化合物 2 和 4 可上调 BDNF 表达而发挥其抗抑郁活性。

关键词: 锦葵科; 秋葵属; 抗抑郁; 黄酮类化合物; 脑源性神经营养因子; 酪氨酸受体激酶 B

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 02-0222-07

Antidepressant activity of flavonoid ethanol extract of *Abelmoschus manihot* corolla with BDNF up-regulation in the hippocampus

CAI Hong-die¹, TAO Wei-wei^{1,2}, SU Shu-lan^{1*}, GUO Sheng¹, ZHU Yue¹,
GUO Jian-ming¹, QIAN Da-wei¹, CONG Xu-dong³, TANG Ren-mao³, DUAN Jin-ao^{1*}

(1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, and National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Center for Translational Systems Biology and Neuroscience, Laboratory of Integrative Biomedicine of Brain Diseases, School of Basic Biomedical Science, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. SZYY Group Pharmaceutical Limited, Jiangyan 225500, China)

Abstract: *Abelmoschus manihot* (L.) Medic., a folk herbal medicine in China, is a flowering plant belonging

收稿日期: 2016-08-03; 修回日期: 2016-09-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473408); 江苏省方剂高技术研究重点实验室建设项目 (BM2010578); 江苏省中药学优势学科 II 期建设项目 (ysxk-2014); 2013 年国家教育部“新世纪优秀人才”计划项目 (NCET-13-0873); 江苏省“333 高层次人才培养工程”资助项目 (BRA2015391).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-85811917, E-mail: sushulan1974@163.com;

Tel / Fax: 86-25-85811291, E-mail: dja@njuucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0764

to *Abelmoschus* L. genus and Malvaceae family, which has been reported with an antidepressant activity. The study was designed to isolate flavonoids from *Abelmoschus manihot* corolla and explore the action mechanism of antidepressant activities. The flavonoids were isolated and purified by D101 macroporous resin column, polyamide column and Sephadex LH-20 sequentially and identified as myricetin-3-*O*- β -*D*-glucoside (**1**), gossypetin-8-*O*- β -*D*-glucuronide (**2**, G-8-G), gossypetin-3'-*O*- β -*D*-glucoside (**3**), quercetin-3'-glucoside (**4**, Q-3-G), isoquercitrin (**5**, IQT), hyperoside (**6**, HY), myricetin (**7**), quercetin (**8**, QT). Compounds **2**, **4**, **5**, **6** and **8** (15, 30 and 60 mg·kg⁻¹) were orally administered to mice and the reaction was observed in tail suspension test (TST) and forced swimming test (FST). Western blot analysis was used in determination of the protein expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), tyrosine receptor kinase B (TrkB) and phosphorylation eukaryotic elongation factor 2 (p-eEF2). The results revealed that only Q-3-G and G-8-G (15, 30, 60 mg·kg⁻¹) significantly reduced the immobility time in FST and TST. Furthermore, Q-3-G and G-8-G remarkably increased the expression of BDNF and TrkB, and decreased the expression of p-eEF2. These results suggest that Q-3-G and G-8-G had an obvious antidepressant activity via up-regulation of BDNF expression. The new observation will provide a new direction in the development of antidepressant in the treatment of major depressive disorder (MDD).

Key words: Malvaceae; *Abelmoschus*; antidepressant activity; flavonoid; brain derived neurotrophic factor; tyrosine receptor kinase B

重度抑郁症 (MDD) 是一种以持久的情绪低落和快感缺乏为特点的精神疾病, 它影响着人们的生活质量和身体健康, 甚至严重者导致自杀。世界卫生组织 (WHO) 指出, 在 21 世纪人类面临最大的疾病是精神疾病, 特别是抑郁症, 且在未来 15 到 20 年, 同其他疾病相比, 精神疾病的全球医疗费用将排名第二^[1]。此外, 抑郁症的发病率呈上升趋势, 仅次于心血管疾病的发病率^[2]。因此, 对于抑郁症的预防和治疗是目前研究的热点问题。

黄蜀葵花为锦葵科植物黄蜀葵 (*Abelmoschus manihot* (L.) Medic.) 的干燥花冠。始载于《嘉佑本草》, 后收录于《本草纲目》。其味甘、辛, 性凉。归心、肾、膀胱经。具有利尿通淋、活血、止血、消肿解毒的功效。现代研究表明, 黄蜀葵花具有显著的药理活性, 如抗炎、抗氧化、抗凝血、抗心肌缺血坏死和缺血性脑损伤的保护, 延缓肾小管损害和肾纤维化治疗慢性肾脏疾病, 降低血糖, 促进血管生成等^[3-9]。据报道, 黄蜀葵花黄酮类成分对小鼠中风后抑郁症损伤具有明显保护作用^[10, 11]。研究亦显示, 黄蜀葵花的乙醇提取物表现出显著抗抑郁活性, 灌胃给药后, 在大鼠脑中检测到异槲皮苷 (IQT)、金丝桃苷 (HY)、棉皮素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖醛酸 (G-8-G)、槲皮素-3'-葡萄糖苷 (Q-3-G) 和槲皮素 (QT)^[12-14]。然而, 黄蜀葵花中黄酮类化合物的抗抑郁作用机制尚未完全阐明。

本研究采用色谱分离方法分离、纯化和鉴定黄蜀葵花中主要黄酮类化合物; 采用悬尾实验 (TST) 和强迫游泳实验 (FST) 评价主要黄酮类化合物的抗抑

郁活性; 采用 Western blot 技术评价化合物对小鼠海马组织中脑源性神经营养因子 (BDNF)、海马酪氨酸受体激酶 B (TrkB) 和磷酸化的真核延伸因子 2 (p-eEF2) 的蛋白表达水平, 以期揭示黄蜀葵花抗抑郁的作用机制, 为其深入研究及开发利用提供科学依据。

材料与方法

实验材料 ACQUITY UPLC 系统 (二元高压泵, 自动进样器, 柱温箱, 光电二极管阵列检测器, Empower 2 色谱工作站, Waters 公司); DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); Sartorius BT125D 电子分析天平 (德国塞利多斯公司); EPED 超纯水系统 (南京易普达易科技发展有限公司); KQ-250E 型超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司); AnkeGL-16 GII 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); Thermo Synchronis C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) 色谱柱; Germany Bruker Avance AV-500/300 NMR 光谱 (TMS 为内标); YRE-301 旋转蒸发器 (巩义市, 予华仪器有限公司); Sephadex LH-2 (通用电气医疗集团生物科技); D101 大孔树脂柱和聚酰胺柱 (60~100 目) (河北沧州宝精细化工有限公司)。

甲醇 (南京化学试剂有限公司) 为分析纯, 乙腈 (美国 TEDIA 公司) 及甲酸均为色谱纯 (美国 ACS 公司), 超纯水由 Milli-Q 纯水机制备。槲皮素-3'-葡萄糖苷 (纯度 98%)、异槲皮苷 (纯度 98%)、杨梅素

(纯度 98%)、槲皮素 (纯度 98%) 和金丝桃苷 (纯度 98%) 购自南京春秋生物工程有限公司。氯胺酮 (纯度 99.9%) (中国古田制药); 黄蜀葵花 80%乙醇提取物 (14060703) 由江苏苏中药业集团有限公司提供; 提取所用药材经南京中医药大学段金廛教授鉴定为锦葵科黄蜀葵 [*Abelmoschus manihot* (L.) Medic.] 植物的干燥花冠。

黄酮化合物的分离纯化与鉴定方法 干燥黄蜀葵花 (20 kg) 经 80%乙醇 (120 L×3) 回流提取 3 次, 合并 3 次提取液, 浓缩得 8 L 浸膏, 依次用石油醚 (18 L) 和乙酸乙酯 (18 L) 分别萃取 3 次。萃取液 5 L 上 D101 大孔吸附树脂 (0.25~0.84 mm) 柱 (15 cm×100 cm) 分离, 依次采用纯水 (50 L)、30%乙醇 (55 L)、60%乙醇洗脱 (30 L) 及 95%乙醇 (20 L) 进行洗脱。30%和 60%的洗脱液分别浓缩到 1.5 L 和 1 L, 30%乙醇浓缩液于聚酰胺树脂柱 (15 cm×100 cm), 依次用纯水 (40 L)、20%乙醇 (20 L)、50%乙醇 (20 L) (均含 0.1%乙酸) 洗脱。20%和 50%的洗脱液均浓缩至 500 mL, 分别吸取 20%、50%、60%的浓缩液 10 mL 于 Sephadex LH-20 柱 (3×200 cm) 上分离, 用甲醇 (1 L) 洗脱, 每收集 100 mL 洗脱液后, 进样 2 μL , 根据色谱及光谱特征, 合并相同馏分。经甲醇重结晶, 得到化合物 **1~8**。流动相为 0.1%甲酸水 (A)-乙腈 (B), 优化梯度为 0~2 min: 14% B~17% B; 2~5 min: 17% B~18% B; 5~6 min: 18% B~19% B; 6~9 min: 19% B~35% B; 9~10 min: 35%~14% B; 10~11 min: 14% B。将纯化的化合物 **1~4** 溶于 $\text{DMSO-}d_6$ 通过 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 分析, 化合物 **5~8** 与对照品的保留时间及光谱特征进行比较。

动物和实验分组设计 清洁级雄性远交昆明小鼠 136 只, 年龄 6~8 周龄 (18~22 g), 均由南京中医药大学实验动物中心提供 (合格证号 H35020148), 动物实验获得南京中医药大学的研究伦理委员会的批准, 所有实验程序都按照实验动物的护理和使用指南进行。小鼠适应性喂养 1 周, 自由进食进水, 自然光昼夜节律照射, 控制室内温度 (25±1) °C 及湿度 40%~60%。根据体重随机分为 17 组, 每组 8 只: 空白对照组, 氯胺酮阳性药组, G-8-G 低、中、高剂量组, Q-3-G 低、中、高剂量组, IQT 低、中、高剂量组, HY 低、中、高剂量组, QT 低、中、高剂量组。

动物给药 化合物 G-8-G、Q-3-G、IQT、HY、QT (经 UHPLC 检测其纯度高于 95%) 分别分散于

0.5% Tween 80 溶液中, 配置成低、中、高浓度 (1.5、3 和 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。空白对照组灌胃 0.5% Tween 80。氯胺酮溶解于生理盐水中, 配置成质量浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的阳性对照药。按照 10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃小鼠, 24 h 后进行行为测试。

悬尾实验 (tail suspension test, TST) 悬尾实验的操作步骤与文献^[15]中报道的相似。此实验于微机化设备上, 允许 4 只小鼠在同一时间进行测试。动物的整个过程被录像。在小鼠尾巴尖 1 cm 处贴上粘合带, 将其悬浮于离地面 50 cm 处, 实验悬挂 6 min, 适应 2 min, 记录后 4 min 内小鼠累计不动时间。

强迫游泳实验 (forced swimming test, FST) 小鼠放入水深 15 cm、直径 10 cm、高 25 cm 的玻璃缸中, 水温维持在 (25±1) °C, 小鼠后肢不触及缸底, 前肢不附于缸壁顶部。动物的整个过程被录像。实验共观察 6 min, 适应 2 min, 记录后 4 min 内小鼠累计漂浮不动时间。小鼠游泳结束后及时用吹风机处理干燥, 并严格控制水温, 每只小鼠实验前更换实验用水。

BDNF、TrkB 和 p-eEF2 蛋白表达检测 取空白对照组、氯胺酮 (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、G-8-G (30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、Q-3-G (30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 给药组给药 24 h 后小鼠整个腹侧和背侧的海马组织, 将其溶解于含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂缓冲液中。通过 BCA 测定法 (Pierce, 罗克福德, IL, 美国) 检测蛋白质浓度。蛋白裂解物用 12% 的 SDS-PAGE 电泳分离, 随后转移到聚乙二氟乙烯膜。5% BSA 封闭 1 h 后, 4 °C 下与 BDNF (圣克鲁斯生物技术, SC-546, 1:200)、TrkB (1:500)、p-eEF2 (细胞信号技术, 2332, 1:500) 和 β -tubulin (细胞信号技术, 1:200) 抗体杂交过夜, 孵育二抗常温杂交 1 h, 加入超级信号西方 Pico 化学发光底物 (赛默飞世尔科技公司), 放入凝胶成像仪中曝光, 使用 Gel-Pro analyzer 4.0 软件对条带进行定量分析, 得出各条带积分吸光度 IA, 以 β -tubulin 作为内参进行校正。所有实验重复 3 次。

蛋白表达量 = (目的蛋白给药组 IA / β -tubulin 给药组 IA)

蛋白相对表达量 = (目的蛋白给药组 IA / β -tubulin 给药组 IA) / (目的蛋白空白对照组 IA / β -tubulin 空白对照组 IA)

统计学分析 实验数据用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 结果用平均值±标准方差表示, 多组数据的组间比较采用单因素方差分析 Newman-Keuls 多重检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结果

1 黄酮类化合物的鉴定

化合物 1~8 均为黄色粉末, 薄层色谱法点样后于紫外分光光度计 254 nm 波长下呈现黄色斑点, 盐酸-镁粉反应均显红色, 化合物 1~6 Molish 反应显红色, 化合物 7、8 无明显现象, 说明化合物 1~6 可能为黄酮苷类, 化合物 7、8 为黄酮苷元类。化合物 5~8 的化学位移 R_f 值和保留时间 t_R 分别与 IQT、HY、杨梅素和 QT 的对照品一致。因此, 化合物 5

鉴定为 IQT, 6 鉴定为 HY, 7 鉴定为杨梅素, 8 鉴定为 QT。化合物 1~4 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据详见表 1 和表 2, 根据文献^[16-18]比对, 分别鉴定为杨梅素-3- O - β -D-葡萄糖苷、G-8-G、棉皮素-3'- O - β -D-葡萄糖苷和 Q-3-G。经 UHPLC 检测, 化合物 1~8 的纯度均高于 95%, 其结构式如图 1 所示。

2 悬尾实验和强迫游泳实验

单次灌胃给药 24 h 后, 与空白对照组相比, 阳性药氯胺酮 ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 给药组能显著缩短小鼠在

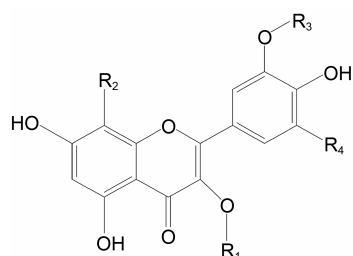
Table 1 ^1H NMR data (δ/ppm) for 1-4 measured in DMSO- d_6 . J in Hz

Position	Compound 1	Compound 2	Compound 3	Compound 4
	myricetin-3- O - β -D-glucoside	gossypetin-8- O - β -D-glucuronide	gossypetin-3'- O - β -D-glucoside	quercetin-3'-glucoside
H-6	6.20, d, 2.1	6.26, s	6.26, s	6.20, d, 2.0
H-8	6.40, d, 2.0			6.50, d, 2.0
H-2'	7.20, s	7.96, d, 2.2	8.08, d, 1.4	7.96, d, 2.1
H-5'		6.86, d, 8.5	7.00, d, 8.6	6.98, d, 8.6
H-6'	7.21, s	7.67, dd, 8.5, 2.2	7.92, dd, 8.6, 1.6	7.85, dd, 8.6, 2.1
G-1'	5.47, d, 7.7	4.74, d, 7.8	4.84, d, 7.2	4.79, d, 7.3
OH-3		9.36, s	9.43, s	9.49, s
OH-5	12.65, s	12.40, s	11.91, s	12.47, s
OH-7	10.95, s	10.90, s	10.42, s	10.79, s
OH-8			8.63, s	
OH-3'	9.46, s	9.36, s		
OH-4'	9.19, s	9.36, s	9.38, s	9.36, s
OH-5'	9.41, s			

Table 2 ^{13}C NMR data (δ/ppm) for 1-4 measured in DMSO- d_6

Position	Compound 1	Compound 2	Compound 3	Compound 4
	myricetin-3- O - β -D-glucoside	gossypetin-8- O - β -D-glucuronide	gossypetin-3'- O - β -D-glucoside	quercetin-3'-glucoside
2	148.9	148.0	145.6	146.7
3	134.2	136.0	136.2	136.4
4	177.8	176.2	176.6	176.4
5	161.7	156.9	152.9	161.1
6	99.1	98.8	98.5	98.7
7	164.6	157.0	153.6	164.4
8	93.8	125.6	124.9	94.1
9	156.7	148.7	149.2	156.6
10	104.4	106.9	103.2	103.5
1'	120.5	122.3	122.9	124.0
2'	108.9	116.2	116.3	116.3
3'	145.8	116.2	116.2	145.7
4'	137.1	145.5	145.5	149.2
5'	145.3	116.2	116.4	116.4
6'	108.9	120.9	123.9	122.7
G-1	101.3	103.3	102.4	102.9
G-2	74.4	74.4	73.7	73.7
G-3	77.0	75.9	76.5	76.4
G-4	70.4	72.0	69.7	70.0
G-5	78.1	76.6	77.3	77.7
G-6	61.5	171.0	60.7	61.0

悬尾实验和强迫游泳实验中的不动时间，缩短率分别为 55.06% 和 34.82% ($P < 0.001$)。化合物 G-8-G 和 Q-3-G (15、30、60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 干预后，不动时间较空白对照组也明显缩短，G-8-G 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的缩短率分别为 32.63% ($P < 0.01$) 和 25.58% ($P < 0.001$)，30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的缩短率分别为 50.33% ($P < 0.01$) 和 32.37% ($P < 0.001$)，60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的缩短率分别为 53.75% ($P < 0.001$) 和 51.66% ($P < 0.001$)；Q-3-G 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的缩短率分别



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	glu	H	H	OH
2	H	O-gu	H	H
3	H	OH	glu	H
4	H	H	glu	H
5	glu	H	H	H
6	gal	H	H	H
7	H	H	H	OH
8	H	H	H	H

Figure 1 Chemical structures of compounds 1–8. gu: Glucuronide; glu: Glucose; gal: Galactose

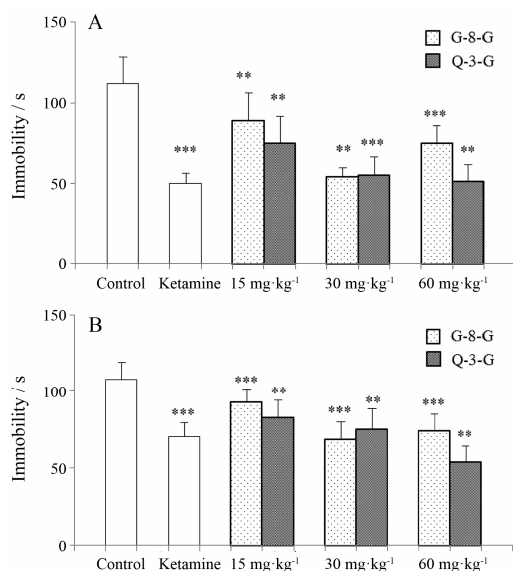


Figure 2 Effects of ketamine (10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), G-8-G and Q-3-G (15, 30, 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) on the TST (A) and FST (B) carried out at 24 h after administration. Immobility time was measured for the last 4 min during the 6 min testing time. G-8-G: Gossypetin-8-*O*- β -*D*-glucuronide; Q-3-G: Quercetin-3'-*O*- β -*D*-glucoside; TST: Tail suspension test; FST: Forced swimming test. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

为 20.37% ($P < 0.01$) 和 16.53% ($P < 0.01$)，30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的缩短率分别为 51.32% ($P < 0.001$) 和 38.35% ($P < 0.01$)，60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的缩短率分别为 32.98% ($P < 0.01$) 和 33.66% ($P < 0.01$)，如图 2 所示。化合物 IQT、HY、QT 未见明显作用，与空白组相比无统计学差异 ($P > 0.05$)。

3 BDNF、TrkB 和 p-eEF2 蛋白表达量测定

与空白对照组相比，氯胺酮 (10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、G-8-G (30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、Q-3-G (30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 给药组的 BDNF 和 TrkB 蛋白表达量明显升高，p-eEF2 蛋白表达量明显下降。氯胺酮组、G-8-G 组、Q-3-G BDNF 蛋白的相对表达量分别为 1.71 ($P < 0.001$)、1.48 ($P < 0.01$)、1.52 ($P < 0.001$)，如图 3 所示；TrkB 蛋白的相对表达量分别为 1.69、1.47、1.62 ($P < 0.01$)，如图 4 所示；p-eEF2 的相对表达量分别为 0.66、0.75、0.71 ($P < 0.01$)，如图 5 所示。

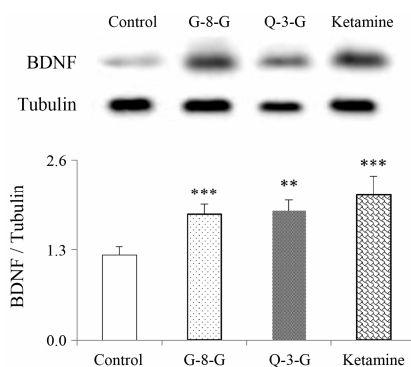


Figure 3 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein expression determined by Western blot at 24 h after an independent administration of ketamine (10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), G-8-G (30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Q-3-G (30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

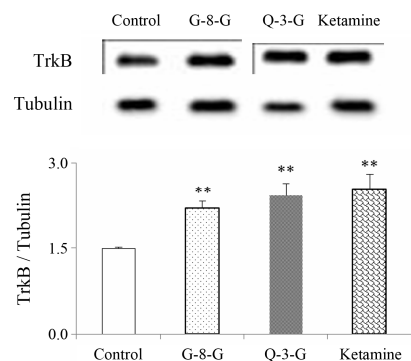


Figure 4 Tyrosine receptor kinase B (TrkB) protein expression determined by Western blot at 24 h after an independent administration of ketamine (10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), G-8-G (30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Q-3-G (30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

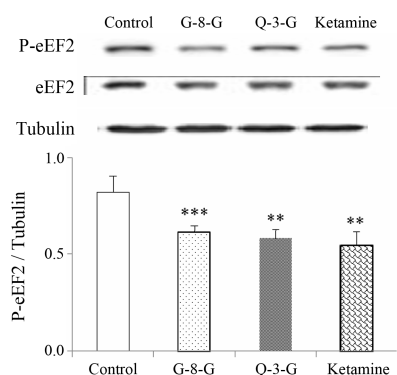


Figure 5 Phosphorylation eukaryotic elongation factor 2 (p-eEF2) protein expression determined by Western blot at 24 h after an independent administration of ketamine ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), G-8-G ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Q-3-G ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group

讨论

前期研究^[14]表明, 黄蜀葵花的乙醇提取物具有显著的抗抑郁作用。本文研究结果进一步揭示了黄蜀葵花 80%乙醇提取物中的 HY、IQT、G-8-G、Q-3-G 和 QT 5 个黄酮类化合物抗抑郁活性及其作用机制。其中, G-8-G 和 Q-3-G 能显著降低小鼠在悬尾实验和强迫游泳实验中的不动时间, 与氯胺酮作用相似, 表现出显著的抗抑郁活性, 而 HY、IQT 和 QT 未见明显效应。而且 Q-3-G 和 G-8-G 在 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量给药时, 小鼠悬尾实验和强迫游泳实验中不动时间的缩短率均高于 15 、 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度, 且其作用强度与氯胺酮 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 相似。因此, 文中选择 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 作为评价 G-8-G 和 Q-3-G 的抗抑郁作用机制。

神经营养因子是生长因子, 在神经系统的发育和维持中起重要作用。BDNF 是神经营养因子家族中继神经生长因子 (NGF) 之后的第二个成员。BDNF 结合 TrkB 后, 细胞内信号转导通路启动, 发挥相应的细胞保护、促进神经元的再生等生物活性^[19-22]。最近研究报告指出, 特定的大脑区域, BDNF 的表达增加和突触可塑性的增强与抗抑郁活性密切相关^[23,24]。eEF2 激酶磷酸化抑制后能显著促进 BDNF 蛋白翻译, 增加 BDNF 蛋白的表达, 从而发挥抗抑郁作用。临床研究与动物实验研究表明, 氯胺酮的麻醉剂量 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 可以显著减少 eEF2 磷酸化, 提高 BDNF 的表达, 缓解抑郁症状, 并且这种作用在啮齿动物体内可持续多天^[25-27]。研究^[14]表明, 口服给药氯胺酮 2 h 和 24 h 后, BDNF 和 TrkB 的表达均显著上升, 且在 24 h 时表达更高。

本文研究结果表明, 化合物 G-8-G 和 Q-3-G 的作用与氯胺酮相似, 单次给药 24 h 后均能显著增加 TrkB

的表达, 降低 p-eEF2 的表达, 与检测到的 BDNF 蛋白表达上调的结果一致。因此, G-8-G 和 Q-3-G 能够通过调节 BDNF/TrkB/p-eEF2 信号通路缓解抑郁症。然而, 抑郁症发病机制复杂, 涉及许多靶蛋白和相应的信号传导途径, 如谷氨酸通路、下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴 (HPA) 的激活等^[17,28]。因此, 黄蜀葵花中黄酮类化合物抗抑郁的作用机制值得更加深入细致的研究, 为其开发用于治疗 MDD 的抗抑郁剂提供数据支撑。

References

- [1] Adewuya AO, Ola BO, Aloba OO, et al. Impact of postnatal depression on infants growth in Nigeria [J]. *J Affect Disord*, 2008, 108: 191-193.
- [2] Weich S, Lewis G. Poverty unemployment and common mental disorders: population based cohort study [J]. *BMJ*, 1998, 317: 115-119.
- [3] Fan L, Liu Q, Liao Y. Tacrolimus is an alternative therapy option for the treatment of adult steroid-resistant nephrotic syndrome: a prospective, multicenter clinical trial [J]. *Int Urol Nephrol*, 2013, 45: 459-468.
- [4] Liu KH, Wang L, Zhang Y. The clinical research of okra in treatment of diabetic nephropathy [J]. *Jilin Med (吉林医学)*, 2005, 26: 1022-1024.
- [5] Li QL, Wang CY, Peng DY, et al. Protective effects of total flavone from the flowers of *Ablemoschl manihot* L. Medic on the myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中药实验方剂学杂志)*, 2006, 12: 39-42.
- [6] Wen JY, Chen ZW. Protective effect of pharmacological preconditioning of total flavones of *Ablemoschl manihot* L. Medic on cerebral ischemic reperfusion injury in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2007, 35: 653-661.
- [7] Chen P, Wan YG, Wang CJ, et al. Mechanisms and effects of *Abelmoschus manihot* preparations in treating chronic kidney disease [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2012, 37: 2252-2256.
- [8] Chen G. Studies on the Chemical Constituents and Antihyperglycemic action of *Ablemoschl manihot* L. Medic (黄蜀葵花的化学成分和降糖活性研究) [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2006.
- [9] Pan W. Experimental Study on Angiogenic Effect and Its Mechanism of Total Flavone of *Ablemoschl manihot* (黄蜀葵花总黄酮促血管新生作用及机制的实验研究) [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2010.
- [10] Jiang QH. Antidepressant Effects of Total Flavone of

- Abelmoschus manihot* L. Medic on Post Stroke Depression on Model and Its Mechanisms (黄蜀葵总黄酮对脑卒中后抑郁小鼠模型的影响及机制研究) [D]. Anhui: Anhui Medical University, 2007.
- [11] Wen S, Zhang GQ, Wang YY, et al. Study progress on pharmacological activity of total flavone of *Abelmoschus manihot* [J]. World Chin Med (世界中医药), 2014, 9: 1105–1107.
- [12] Wang WX, Hu XY, Liu P, et al. Screening of antidepressant activities of ten natural flavonoids [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2007, 38: 900–902.
- [13] Zheng MZ, Liu CM, Pan FG, et al. Antidepressant-like effect of hyperoside isolated from *Apocynum venetum* leaves: possible cellular mechanisms [J]. Phytomedicine, 2012, 19: 145–149.
- [14] Guo JM, Xue CF, Duan JA, et al. Anticonvulsant, antidepressant-like activity of *Abelmoschus manihot* ethanol extract and its potential active components *in vivo* [J]. Phytomedicine, 2011, 18: 1250–1254.
- [15] Ren L, Tao WW, Zhang HL, et al. Two standardized fractions of *Gardenia jasminoides* Ellis with rapid antidepressant effects are differentially associated with BDNF up-regulation in the hippocampus [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 187: 66–73.
- [16] Li CM, An YT, Wang T, et al. Isolation and identification of chemical constituents from the flowers of *Abelmoschus manihot* (L.) Medic (III) [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2011, 28: 520–524.
- [17] Li GC, Chen CX, Luo JL, et al. Chemical constituents in hypoglycemic active fraction in leaves of *Myrica rubra* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2011, 42: 863–865.
- [18] Li CM, Wang T, Zhang Y, et al. Isolation and identification of chemical constituents from the flowers of *Abelmoschus manihot* (L.) Medic (II) [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2010, 27: 803–807.
- [19] Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, et al. Expression of brain derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system [J]. Neuroscience, 1997, 78: 431–448.
- [20] Sugimoto T, Kuroda H, Horii Y, et al. Signal transduction pathways through TRK-A and TRK-B receptors in human neuroblastoma cells [J]. Jpn J Cancer Res, 2001, 92: 152–160.
- [21] Skup M, Dwornik A, Macias M, et al. Long-term locomotor training up regulates TrkB (FL) receptor-like proteins, brain derived neurotrophic factor, and neurotrophin 4 with different topographies of expression in oligodendroglia and neurons in the spinal cord [J]. Exp Neurol, 2002, 176: 289–307.
- [22] Monteggia LM, Gideons E, Kavalali ET. The role of eukaryotic elongation factor 2 kinase in rapid antidepressant action of ketamine [J]. Biol Psychiatry, 2013, 73: 1199–1203.
- [23] Li N, Lee B, Liu RJ, et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists [J]. Science, 2010, 329: 959–964.
- [24] Autry AE, Adachi M, Nosyreva E. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses [J]. Nature, 2011, 475: 91–96.
- [25] Zarate Jr CA, Singh JB, Carlson PJ. A randomized trial of an *N*-methyl-*D*-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression [J]. Arch Gen Psychiatry, 2006, 63: 856–864.
- [26] Berman RM, Cappiello A, Anand A, et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients [J]. Biol Psychiatry, 2000, 47: 351–354.
- [27] Price RB, Nock MK, Charney DS, et al. Effects of intravenous ketamine on explicit and implicit measures of suicidality in treatment-resistant depression [J]. Biol Psychiatry, 2009, 66: 522–526.
- [28] Kawabata K, Kawai Y, Terao J. Suppressive effect of quercetin on acute stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in Wistar rats [J]. J Nutr Biochem, 2010, 21: 374–380.