

## 论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.05.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210122.1426.012.html\(2021-01-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210122.1426.012.html(2021-01-25))

## 绿茶多酚改善社会挫败模型小鼠的抑郁行为研究\*

刘志强<sup>1</sup>, 邹永周<sup>2</sup>, 何敏<sup>1</sup>, 杨平<sup>1</sup>, 屈新辉<sup>1△</sup>

(1. 江西省人民医院/南昌大学附属人民医院二部神经内科, 南昌 330000; 2. 江西省景德镇市第一人民医院神经内科 333000)

**[摘要]** **目的** 探讨绿茶多酚对社会挫败模型小鼠的抗抑郁作用及相关机制。**方法** 用 C57BL/6 小鼠建立社会挫败模型;应用强迫游泳行为学方法评估绿茶多酚对模型小鼠抑郁行为的影响;应用水迷宫行为学方法评估茶多酚对模型小鼠认知功能的影响;取各组小鼠海马组织,应用 Western blot 技术测定磷酸化环腺苷效应元件结合蛋白(p-CREB)及脑源性神经生长因子(BDNF)的表达。**结果** 绿茶多酚可以改善社会挫败模型小鼠强迫游泳不动时间,且与浓度相关;绿茶多酚可以减少社会挫败模型小鼠水迷宫潜伏期时间,且与浓度相关;海马区 CREB-BDNF 通路参与绿茶多酚抗抑郁作用的调节。**结论** 绿茶多酚可以通过海马区 CREB-BDNF 通路改善社会挫败抑郁模型鼠的行为。

**[关键词]** 绿茶多酚;强迫游泳;Morris 水迷宫;抑郁症;社会挫败;神经生长因子**[中图分类号]** R-332;R332.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)05-0741-05

## Research on green tea polyphenols improved depressive behavior of social frustration depression model mice\*

LIU Zhiqiang<sup>1</sup>, ZOU Yongzhou<sup>2</sup>, HE Min<sup>1</sup>, YANG Ping<sup>1</sup>, QU Xinhui<sup>1△</sup>

(1. Department of Neurology, Second Department of Jiangxi Provincial People's Hospital / People's Hospital Affiliated to Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330000, China;

2. Department of Neurology, First People's Hospital of Jingdezhen City, Jingdezhen, Jiangxi 333000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the antidepressant effect of green tea polyphenols on social frustration depression model mice and related mechanisms. **Methods** C57BL/6 black mice was used to establish the social frustration model; forced swimming behavior method was used to evaluate the effect of green tea polyphenols on depression behavior in model mice; water maze behavior method was used to evaluate the effects of green tea polyphenols on cognitive function of model mice; Hippocampus of each group were took, and the expression levels of phosphorylated cyclic adenosine phosphate response element binding protein (CREB) and brain-derived nerve growth factor (BDNF) were detected by using Western blot. **Results** Green tea polyphenols could improve the time of forced swimming immobility in model mice, and it was related to the concentration of green tea polyphenols. Green tea polyphenols could reduce the incubation period of the water maze in model mice, and it was related to the concentration of green tea polyphenols. CREB-BDNF pathway in the hippocampus of the mice was involved in the regulation of antidepressant effect of green tea polyphenols. **Conclusion** Green tea polyphenols can improve the behavior of social frustration depression model mice through the CREB-BDNF pathway in the hippocampus.

**[Key words]** green tea polyphenols; forced swimming; Morris water maze; depression disorder; social frustration; nerve growth factor

抑郁症是全球致残性疾病之一。世界卫生组织(WHO)报告指出,2015 年全球抑郁症数量约占总人数的 4.4%,其中女性患病率为 5.1%,男性为 3.6%,全球总患病人数为 3.22 亿人<sup>[1]</sup>。抗抑郁性药物及心

理治疗是目前临床治疗抑郁症的主要手段,但目前诊治的情况不容乐观,有研究显示其复发率高达 80%<sup>[2]</sup>。有研究指出抑郁症与执行功能障碍、工作记忆及反应速度等认知功能下降有关,而海马是学习记

\* 基金项目:江西省卫生健康委科技计划资助项目(20203027)。 作者简介:刘志强(1987-),主治医师,博士,主要从事认知功能、焦虑、抑郁、成瘾研究。 △ 通信作者, E-mail: quxinhui@163.com。

忆的重要部位,但具体调节机制尚不明确。因此对抑郁症药物及其机制的研究成为焦点。

绿茶的主要成分绿茶多酚已被证实具有抗氧化作用,且有很高的安全性。有研究发现长期饮茶的人群抑郁症的患病率低<sup>[3]</sup>,但具体机制尚不明确。国外<sup>[4]</sup>及国内<sup>[5]</sup>发现绿茶多酚对强迫游泳小鼠及悬尾试验小鼠等抑郁模型具有抗抑郁作用,但对抗抑郁的具体机制研究不够深入。社会挫败模型是一种模拟社会和心理因素产生抑郁症的一种模型,被广泛应用。本实验以社会挫败模型研究绿茶多酚对其抑郁作用的影响及相关机制,现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、仪器设备、药品和试剂

3月龄CD1小鼠,2月龄C57BL/6小鼠购于北京维通利华公司,绿茶多酚(C0567)、磷酸化环腺苷效应元件结合蛋白(cAMP response element-binding protein, p-CREB)抗体(06-519)、脑源性神经生长因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)抗体、K252a 购于美国 Sigma 公司。Western blot 显影系统、强迫游泳行为学系统、水迷宫行为学系统。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 社会挫败模型的建立

筛选攻击能力强的 CD1 小鼠,将 C57BL/6 小鼠放入 CD1 的笼子中,每天接触 10 min,其他时间用带小孔的透明隔板将两小鼠分开。每天将 C57BL/6 小鼠暴露给不同的 CD1 小鼠,10 d 之后进行社会交互实验的检测。进一步使用强迫游泳行为学系统、水迷宫行为学系统评估小鼠抑郁模型,对不符合要求的小鼠予以剔除。

#### 1.2.2 强迫游泳

将小鼠放在一个高 20 cm、直径 15 cm、水深 10 cm、水温为(23±2)℃的盛水容器中,给小鼠制造一个无法逃离的环境,一段时间后,小鼠即表现出不动状态。先进行适应训练 2 d,第 3 天记录后 4 min 中内总共静止的时间。

#### 1.2.3 水迷宫

将小鼠头面向池壁放在水中,记录小鼠找到平台所用时间(s)。在训练时,如果这个时间超过 60 s,则引导小鼠到平台。让小鼠在平台上待 10 s。每只动物每天训练 4 次,训练间隔 15~20 min,连续训练 5 d。上述训练结束后的第 2 天将平台撤除,进行探查训练,共 60 s。探查训练后的第 2 天,进行对位训练,共 4 d。将平台放回原平台所在的对侧象限,每天训练 4 次,统计达到平台所用的时间。

#### 1.2.4 对抑郁模型鼠腹腔注射不同浓度的绿茶多酚

取模型鼠 24 只分为 3 组,每组 8 只,分别为低剂量绿茶多酚(5 mg/kg)处理组,高剂量绿茶多酚(20 mg/kg)处理组及生理盐水处理组;另选取为正常 C57BL/6 鼠给予生理盐水处理,为空白对照组。对上述小鼠连续 1 周给予上述药物或生理盐水处理,每天

给药时间固定,饲养条件相同。1 周后先进行适应训练,后进行强迫游泳、水迷宫等行为学检测。

### 1.2.5 海马组织微量注射 BDNF 阻断剂 K252a

取模型鼠 24 只分为 3 组,每组 8 只,分别为高剂量绿茶多酚(20 mg/kg)处理组、K252a+高剂量绿茶多酚(20 mg/kg)处理组及生理盐水处理组;C57BL/6 小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,固定在立体定向架上。切开头皮,在左右海马头骨上打孔。坐标为:前囟门后 1.7 mm,中线附近±1.8 mm,硬脑膜下深度 2.0 mm。植入套管,缝合皮肤。术后腹腔注射青霉素 3 d。在绿茶多酚处理前,双侧海马微量注射 K252a,每侧体积 0.5 μL,注射速率 0.2 μL/min,海马微量注射 K252a 剂量为 10 μg/μL,其余各组注射等量生理盐水溶液。随后高剂量绿茶多酚处理组、K252a+高剂量绿茶多酚处理组注射绿茶多酚 20 mg/kg,生理盐水处理组注射等量生理盐水。手术后,小鼠能自主活动后被关在笼子里。

### 1.2.6 Western blot 技术测定 CREB、p-CREB 及 BDNF 表达

取空白对照组、模型组、低剂量绿茶多酚组、高剂量绿茶多酚组 C57BL/6 小鼠各 8 只,断头处死小鼠,迅速取脑剥离获取双侧海马组织,用离心管分装,加入适量的蛋白裂解液,用匀浆器充分研磨组织,放置于冰上裂解 30 min,将组织放于高速离心机离心 15 min(12 000 r/min,4℃),吸取上清液,用 BCA 法定量蛋白浓度。将样本与上样缓冲液按体积 3:1 加入 4×上样缓冲液,混匀,在 100℃水中煮沸 5 min,分装后置于-20℃冰箱冻存备用。用 BCA 法进行蛋白定量,各泳道加入 30 μg 蛋白,先用恒流后用恒压进行蛋白的电泳分离,转膜至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,转膜时间为 1 h。用 10%的脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗 p-CREB 抗体(1:2 000)、CREB 抗体(1:2 000)、BDNF 抗体(1:500)4℃孵育过夜,用 TBST 冲洗 3 次,加入二抗(1:3 000)室温孵育 1 h, TBST 冲洗 3 次后加入 ECL 液显色。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多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。

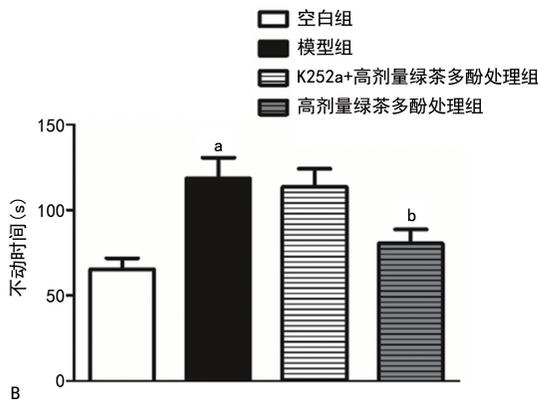
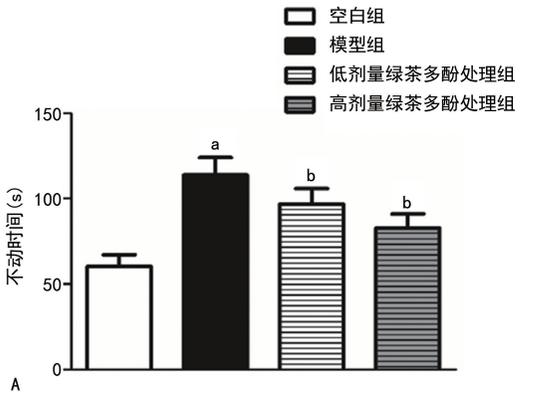
## 2 结果

### 2.1 绿茶多酚可以改善模型小鼠强迫游泳不动时间且与浓度相关

与空白组[(60.3±3.9)s]小鼠比较,模型组[(113.8±10.3)s]小鼠的强迫游泳不动时间明显延长( $P < 0.05, n = 8$ );与模型组小鼠比较,低剂量绿茶多酚处理组[(96.7±9.2)s]和高剂量绿茶多酚处理组[(82.8±8.3)s]小鼠强迫游泳不动时间都下降,且绿茶多酚高剂量处理组下降得更明显( $P < 0.05, n = 8$ ),见图 1A。与模型组[(118.6±12.2)s]小鼠比较,高剂量绿茶多酚处理组[(80.6±8.1)s]小鼠强迫游

泳不动时间下降( $P < 0.05, n = 8$ ),而 K252a 能够逆转高剂量绿茶多酚的作用,K252a+高剂量绿茶多酚处理组[(118.6±12.2)s]小鼠强迫游泳不动时间与模型组[(113.5±8.7)s]比较,差异无统计学意义( $P > 0.05, n = 8$ )。见图 1B。

较,高剂量绿茶多酚处理组[(33.6±3.4)s]小鼠水迷宫潜伏期时间下降( $P < 0.05, n = 8$ ),而 K252a 能够逆转高剂量绿茶多酚的作用,水迷宫潜伏期时间与模型组比较,K252a+高剂量绿茶多酚处理组[(45.3±4.1)s]差异无统计学意义( $P > 0.05, n = 8$ ),见图 2B。

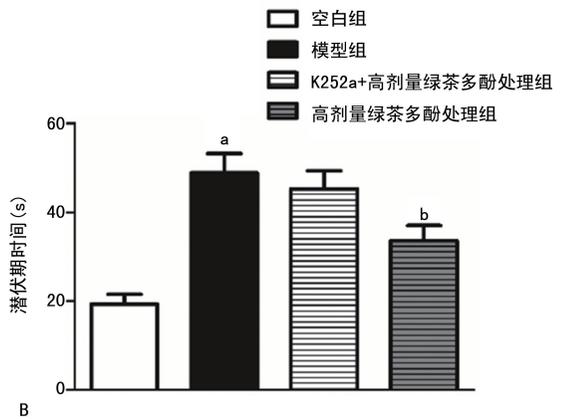
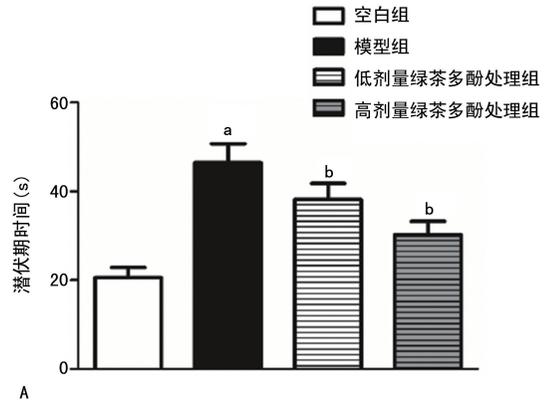


A:各组小鼠强迫游泳不动时间;B:海马微量注射 K252a 后各组小鼠强迫游泳不动时间。<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与空白组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与模型组比较。

图 1 绿茶多酚对模型小鼠强迫游泳不动时间的影响

## 2.2 绿茶多酚可以减少模型小鼠水迷宫潜伏期时间,且与浓度相关。

社会模型组[(46.4±4.3)s]小鼠的水迷宫潜伏期时间明显长于空白组[(20.5±2.4)s]小鼠( $P < 0.05, n = 8$ );单因素方差分析发现,与模型组比较,低剂量[(38.2±3.6)s]和高剂量绿茶多酚处理组[(30.2±3.1)s]小鼠水迷宫潜伏期时间都下降,且高剂量绿茶多酚处理组潜伏期时间下降更明显( $P < 0.05, n = 8$ ),见图 2A。与模型组[(48.9±4.3)s]比

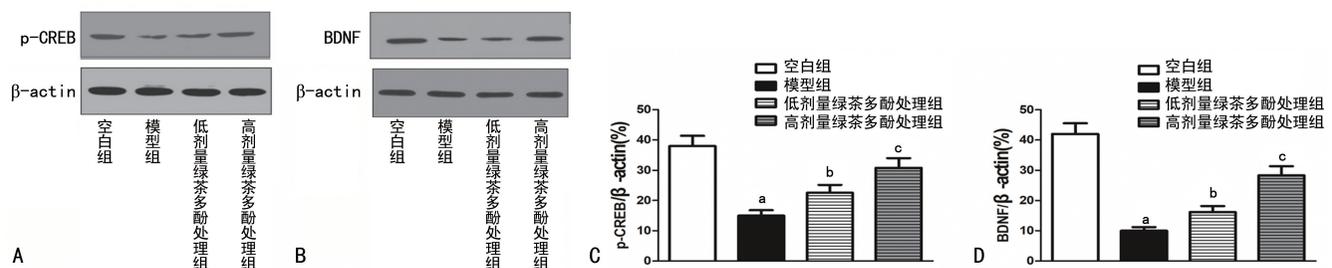


A:各组小鼠水迷宫潜伏期时间;B:海马微量注射 K252a 后各组小鼠水迷宫潜伏期时间。<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与空白组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与模型组比较。

图 2 绿茶多酚对模型小鼠水迷宫潜伏期时间的影响

## 2.3 小鼠海马区 CREB-BDNF 通路参与绿茶多酚抗抑郁作用的调节。

与空白组比较,模型组小鼠海马区蛋白 p-CREB 相对表达水平、BDNF 相对表达水平都下降( $P < 0.05, n = 8$ )。而与模型组比较,低剂量和高剂量绿茶多酚处理组海马区 p-CREB 相对表达水平、BDNF 相对表达水平表达升高,且高剂量组逆转更明显( $P < 0.05, n = 8$ ),见图 3。



A,B:Western blot 图;C,D:Western blot 分析图。<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与空白组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与模型组比较;<sup>c</sup>: $P < 0.01$ ,与模型组比较。

图 3 各组鼠海马区 p-CREB、BDNF 水平变化的 Western blot 检测结果

### 3 讨 论

抑郁症也称为单相抑郁,是全球致残性疾病之一。美国资料显示,抑郁症人群中的年自杀率为 83.3/10 万,中国的年自杀率已达 22.2/10 万<sup>[6]</sup>。抗抑郁性药物及心理治疗是目前临床治疗抑郁症的主要手段,但目前诊治的情况不容乐观,有研究估计大约 1/3 的患者经治疗 4 个月后症状缓解<sup>[7]</sup>。治疗抑郁症的进展一直很缓慢,部分原因是制药行业退出了新型精神药物的开发,因此探索新的抑郁症药物及其机制意义重大。

绿茶多酚已被证实具有抗氧化作用,它经口服吸收后分布广泛,能够透过血脑屏障到达脑组织起着重要的神经保护作用,且安全性很高。有研究发现长期饮茶的人群抑郁症的患病率低。74 名健康受试者参与了 1 个双盲随机安慰剂对照研究,连续 5 周口服绿茶或安慰剂,之后进行测量。结果表明,与安慰剂比较,饮用绿茶的参与者抑郁得分有所下降<sup>[8]</sup>。目前认为抑郁症的病因主要是精神应激、遗传因素和反复的躯体疾病,而精神应激为主要病因<sup>[9]</sup>。人类的应激因素无处不在,这些应激源可导致挫败感、情绪低落和兴趣缺失等抑郁症状产生。社会挫败模型是一种模拟社会和心理因素产生抑郁症的一种模型,被广泛应用。其中社会挫败应激模型,可以更好地模拟人类对于应激的反应。通过将小鼠暴露在 10 d 的社会挫败应激中,用以诱导小鼠的抑郁表现,形成社会挫败模型。本研究发现社会挫败模型小鼠的强迫游泳不动时间明显长于正常小鼠,说明社会挫败应激可以成功建立抑郁模型;而腹腔注射绿茶多酚 1 周能够使小鼠强迫游泳不动时间下降,且高剂量绿茶多酚处理组小鼠下降得更明显。

有研究指出抑郁症与执行功能障碍、工作记忆及反应速度等认知功能下降有关。有研究表明约 40% 的抑郁症患者存在至少一种认知领域的损伤<sup>[10]</sup>。同时,1 项 meta 研究结果指出抑郁症治愈后执行功能的损伤可以恢复,表明执行功能的损伤与抑郁同时发生,而不是抑郁症的特征<sup>[11]</sup>。研究发现抑郁症患者与健康对照组比较,海马体积下降是最可靠的神经影像结构发现之一,多项 meta 分析结果表明 4%~10% 患者出现双侧海马体积下降超过 40 年,抑郁病史或者严重的抑郁患者海马体积减少的可能性更大,而使用抗抑郁药物 3 年后左侧海马体积增加,这也间接支持抑郁与海马体积之间的关系<sup>[12]</sup>。本研究结果也发现社会挫败模型小鼠的水迷宫潜伏期时间延长,说明抑郁小鼠认知功能下降。而腹腔注射绿茶多酚 1 周能够使小鼠水迷宫潜伏期时间下降,且绿茶多酚高剂量

组下降得更明显,说明绿茶多酚改善抑郁的作用可能与改善认知功能有关。

很多研究显示,转录因子 CREB 与抑郁症的发病机制及抗抑郁药的效用相关。雏明池等<sup>[13]</sup>研究表明慢性温和和不可预知性应激刺激致抑郁行为改变的小鼠较对照组出现海马内 CREB 表达水平下降<sup>[14]</sup>。而长期使用抗抑郁药物可提高海马 CREB 活性及海马区齿状回神经细胞的增殖和分化功能。有研究使海马 CREB 过度表达,随后激活一些神经生长因子营养因子(如 BDNF)能够促进海马区新生神经细胞增殖、成熟及分化。因此认为 CREB 活性增高可能是抗抑郁作用的机制之一<sup>[13]</sup>。本研究也发现,模型鼠海马区蛋白 p-CREB、BDNF 表达都下降( $P < 0.05$ ),而绿茶多酚处理组可以逆转海马区 p-CREB、BDNF 表达,且高剂量组逆转更明显,表明绿茶多酚通过海马区 CREB-BDNF 通路参与调节社会挫败模型小鼠的抑郁行为。进一步研究也发现,通过双侧海马区微量注射 BDNF 阻断剂 K252a 阻断 BDNF 效应,强迫游泳和水迷宫的行为学试验都证实绿茶多酚改善抑郁行为的效应被 K252a 逆转。

因此,本研究发现绿茶多酚可以通过海马区 CREB-BDNF 通路改善社会挫败模型小鼠的抑郁行为。为绿茶多酚的抗抑郁应用提供更多理论依据。

### 参考文献

- [1] World Health Organization. Depression and other common mental disorders: global health estimates [R]. World Health Organization, 2017.
- [2] PEDRO S, QUIRINO C, FELIPE F, et al. Is sertraline plus transcranial direct current stimulation the future of effective depression treatment? [J]. J Comp Effect Res, 2013, 2(3): 213-220.
- [3] 张莹莹, 卢国华, 范静波. 社区的老年人饮茶、认知与抑郁的关系 [J]. 中国健康心理学杂志, 2014, (8): 1245-1247.
- [4] ROTHENBERG D O, ZHANG L Y. Mechanisms underlying the anti-depressive effects of regular tea consumption [J]. Nutrients, 2019, 1361(11): 124-161.
- [5] ZHU W L, SHI H S, WEI Y M, et al. Green tea polyphenols produce antidepressant-like effects in adult mice [J]. Pharmacol Res, 2012, 65(1): 74-80.

- [6] HAWTON K, COMABELLA C C, HAW C, et al. Risk factors for suicide in individuals with depression: a systematic review [J]. *J Affect Disorders*, 2013, 147(1): 17-28.
- [7] COWEN P J. Backing into the future: pharmacological approaches to the management of resistant depression [J]. *Psychol Med*, 2017, 47(3): 2569-2577.
- [8] ZHANG Q Y, YANG H C, WANG J, et al. Effect of green tea on reward learning in healthy individuals: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study [J]. *Nutr J*, 2013, 12(3): 84-93.
- [9] MARSAY C, MANDERSON L, SUBRAMANEY U. Changes in mood after screening for antenatal anxiety and depression [J]. *J Reprod Infant Psych*, 2018, 36(4): 347-362.
- [10] ROCK P L, ROISER J P, RIEDEL W J, et al. Cognitive impairment in depression: a systematic review and meta-analysis [J]. *Psychol Med*, 2014, 44(10): 2029-2040.
- [11] AHERN E, SEMKOVSKA M. Cognitive functioning in the first-episode of major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis [J]. *Neuropsychology*, 2017, 31(1): 52-61.
- [12] DUSI N, BARLATI S, VITA A, et al. Brain structural effects of antidepressant treatment in major depression [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2015, 13(4): 458-465.
- [13] 雒明池, 梁如, 高树明, 等. 基于 cAMP-CREB-BDNF 信号通路探讨交泰丸抗抑郁的作用机制 [J]. *天津中医药*, 2018, 35(5): 365-369.
- [14] ZHANG M Q, LI R, WANG Y Q, et al. Neural plasticity is involved in physiological sleep, depressive sleep disturbances, and antidepressant treatments [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017(23): 1-16.

(收稿日期: 2020-10-12 修回日期: 2020-12-27)

(上接第 740 页)

- [10] 周珊珊, 刘颖. 内蒙古农村地区育龄妇女头发中 21 种元素含量水平及相互作用 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2016, 36(9): 3068-3074.
- [11] 朱华龙, 熊永伟, 王华. 镉对胚胎/胎儿发育的损害作用及其机制 [J]. *环境与职业医学*, 2019, 36(2): 151-156.
- [12] 彭博, 游园园, 孙黎光. 铅暴露导致小鼠学习记忆功能障碍及海马蛋白激酶 B 表达降低 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(6): 801-805.
- [13] 李宗光, 周繁坤, 尹广明, 等. 低剂量汞、铅和镉联合暴露致大鼠海马神经元细胞损伤的实验研究 [J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52(10): 976-982.
- [14] DALISE S, CAVALLI L, GHUMAN H, et al. Biological effects of dosing aerobic exercise and neuromuscular electrical stimulation in rats [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10830-10842.
- [15] 牛佳媛, 吴子怡, 薛杭, 等. 七氟醚后处理对缺血缺氧性脑损伤新生大鼠行为学及海马中 BDNF 表达的影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2019, 48(10): 870-873, 886.
- [16] 孙向峰, 侯梅, 苑爱云, 等. 丰富环境对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠学习记忆、海马区脑源性神经生长因子和突触素蛋白表达的影响 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2017, 32(4): 296-299.
- [17] NUTTALL J R, OTEIZA P I. Zinc and the aging brain [J]. *Genes Nutr*, 2014, 9(1): 379-390.
- [18] 粟立羽, 丁宏伟, 胡斌丽, 等. 锰中毒大鼠海马锌含量与锌转运蛋白的关系 [J]. *环境与职业医学*, 2017, 34(8): 718-721.
- [19] HUANG L, TEPAAMORNDECH S, KIRSCHKE C P, et al. Subcongenic analysis of a quantitative trait locus affecting body weight and glucose metabolism in zinc transporter 7 (*znt7*)-knockout mice [J]. *BMC Genet*, 2019, 20(1): 19-31.
- [20] 池志宏, 褚晴晴, 贾本智, 等. 锌转运体 7 基因沉默抑制 APP 转基因细胞 APP 表达和 A $\beta$  分泌 [J]. *解剖科学进展*, 2013, 19(3): 209-212.
- [21] FRAZZINI V, GRANZOTTO A, BOMBA M, et al. The pharmacological perturbation of brain zinc impairs BDNF-related signaling and the cognitive performances of young mice [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9768-9779.

(收稿日期: 2020-10-14 修回日期: 2020-12-09)