芦丁改善经前烦躁障碍肝气郁证抑郁症状的机制研究Δ

张艺伟[1*]，宋现良[2]，任亚爽[3]，郭德第[1]，宋润蔚[4]，陈玺泰[1]，赵怀伟[1]，宋春红[4#]（1.山东中医药大学药学院，济南 250355；2.青岛大学附属泰安市中心医院静脉用药集中调配中心，山东 泰安 271000；3.菏泽市立医院临床药理学实验室，山东 菏泽 274000；4.山东第一医科大学附属中心医院实验动物中心，济南 250014）

中图分类号 R965；R285.5　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408（2025）12-1449-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.12.06

摘　要　目的 探索芦丁改善经前烦躁障碍（PMDD）肝气郁证抑郁症状的作用机制。**方法** 采用网络药理学方法挖掘PMDD和芦丁作用的交集靶点，构建蛋白-蛋白相互作用网络以筛选核心靶点，并进行基因本体、京都基因和基因组数据库通路富集分析。利用分子对接技术验证核心靶点和芦丁的结合能力。摘取雌性Wistar大鼠双侧卵巢并进行人工激素诱导后，将其随机分为正常组（10只）和造模组（50只）。取造模组大鼠，以择时束缚应激法构建PMDD肝气郁证模型。将造模成功的大鼠分为模型组、氟西汀组（阳性对照）、芦丁组，每组12只。于每天上午9：00灌胃相应药液或水，持续2个动情周期。利用旷场实验、强迫游泳实验和Y迷宫实验评价芦丁对模型大鼠行为学指标的影响，观察其脑海马组织神经元树突棘密度，检测其血清脑源性神经营养因子（BDNF）水平以及脑海马组织中BDNF、酪氨酸激酶受体B（TrkB）、突触核蛋白（Syn）、突触后密度蛋白95（PSD95）的表达情况。**结果** 网络药理学和分子对接结果显示，芦丁改善PMDD肝气郁证的核心靶点包括BDNF、TrkB、PSD65、Syn等。实验验证结果显示，芦丁可显著增加非接受期PMDD肝气郁证模型大鼠的自发轮流行为得分，缩短悬浮不动时间，提高脑海马组织中神经元树突棘密度，上调血清BDNF水平和脑海马组织中BDNF、TrkB、Syn蛋白的表达（$P<0.05$）；但对接受期模型大鼠上述指标无显著影响（$P>0.05$）。**结论** 芦丁可缓解PMDD肝气郁证模型大鼠的抑郁症状，增强其空间记忆能力，减少神经元损伤；上述作用可能与该成分激活BDNF/TrkB信号通路、上调Syn蛋白的表达有关。

关键词　芦丁；经前烦躁障碍；肝气郁证；脑源性神经营养因子；神经元损伤

Study on the mechanism of rutin in ameliorating depressive symptoms associated with premenstrual dysphoric disorder characterized by liver qi stagnation syndrome

ZHANG Yiwei[1], SONG Xianliang[2], REN Yashuang[3], GUO Dedi[1], SONG Runwei[4], CHEN Xitai[1], ZHAO Huaiwei[1], SONG Chunhong[4] (1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Pharmacy Intravenous Admixture Services, the Affiliated Taian City Central Hospital of Qingdao University, Shandong Taian 271000, China; 3. Clinical Pharmacology Laboratory, Heze Municipal Hospital, Shandong Heze 274000, China; 4. Laboratory Animal Center, Central Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250014, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the mechanisms of rutin in alleviating depressive symptoms associated with premenstrual dysphoric disorder (PMDD) characterized by liver qi stagnation syndrome. **METHODS** Network pharmacology was employed to identify the intersecting targets of action between PMDD and rutin. A protein-protein interaction network was constructed to screen core targets, followed by gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. Molecular docking simulations validated rutin's binding affinity to core targets. The bilateral ovaries of female Wistar rats were removed, followed by artificial hormone induction. The rats were then randomly divided into normal group (10 rats) and modeling group (50 rats). PMDD rat model with liver qi stagnation syndrome was established via restraint stress. The successfully modeled rats were further divided into model group, fluoxetine group (positive control) and rutin group, with 12 rats in each group. The corresponding drug solutions or water were administered by gavage at 9:00 a.m. every day, continuing for two estrous cycles. The open-field test, forced swimming test and Y-maze test were utilized to

Δ**基金项目** 国家重大新药创制课题（No.2017ZX09301064）；山东省自然科学基金面上项目（No.ZR2020MH341）；山东省中医药科技项目（No.2021M121）

＊**第一作者** 硕士研究生。研究方向：情感障碍性疾病的发病机制及中药药理机制。E-mail：zyw15531831502@163.com

＃**通信作者** 主任药师，教授，硕士生导师，博士。研究方向：情感障碍性疾病的发病机制及中药药理机制。E-mail：sch-64552@126.com

evaluate the effects of rutin on the behavioral indexes of model rats. Additionally, the density of neuronal dendritic spines in the hippocampal tissues of the rats was observed. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and the expressions of BDNF, tyrosine kinase receptor type B (TrkB), synuclein (Syn), and postsynaptic density protein 95 (PSD95) in hippocampal tissues were quantified, respectively. **RESULTS** Network pharmacology and molecular docking revealed the core targets through which rutin ameliorated PMDD characterized by liver qi stagnation syndrome included BDNF, TrkB, PSD65, Syn, etc. The results of experimental validation demonstrated that rutin significantly increased the spontaneous alternation behavior scores of PMDD model rats with liver qi stagnation syndrome during the non-receptive phase, shortened their immobility time during the forced swimming test, and enhanced the density of neuronal dendritic spines in the hippocampal tissues. Additionally, rutin upregulated the levels of serum BDNF and the protein expressions of BDNF, TrkB and Syn in the hippocampal tissues ($P<0.05$). However, it had no significant effect on the above indexes in model rats during the receptive phase ($P>0.05$). **CONCLUSIONS** Rutin ameliorates depressive symptoms, enhances spatial memory capabilities, and reduces neuronal damage in PMDD model rats with liver qi stagnation syndrome. These effects may be associated with the activation of BDNF/TrkB signaling pathway and upregulation of Syn protein expression.

KEYWORDS rutin; premenstrual dysphoric disorder; liver qi stagnation syndrome; brain-derived neurotrophic factor; neuronal damage

经前综合征(premenstrual syndrome,PMS)是指女性在月经周期的黄体期(即月经来潮前7～14 d)出现、月经来潮后自然消失的一系列身体、心理和行为症状[1]。其中,经前烦躁障碍(premenstrual dysphoric disorder,PMDD)是PMS的严重类型,可引发焦虑、抑郁、易怒等情绪变化以及乳房胀痛、头痛等身体症状,且上述症状在黄体期出现,月经来潮1周后消失[2]。在全球范围内,有3%～8%的女性符合PMDD诊断标准,这对其工作和生活造成严重影响[3]。Qiao等[4]基于中医角度深度剖析认为,PMDD主要分为肝气郁证和肝气逆证2种亚型,其中PMDD肝气郁证的典型精神症状包括精神萎靡、抑郁等。PMDD发病机制复杂且尚不完全明确,涉及卵巢激素学说、中枢神经递质学说、自主神经系统学说、遗传学说、心理和社会学说等多个方面[5]。临床PMDD的治疗方法主要包括行为认知疗法、卵巢摘除术、药物疗法。认知疗法的效果极不稳定,卵巢摘除术对患者身体伤害较大。药物疗法主要包括激素类药物、五羟色胺再摄取抑制剂等,其中激素类药物虽可明显改善PMDD患者的相关症状[6],但长期服用可增加患者乳腺癌和卵巢癌的发生风险[7];五羟色胺再摄取抑制剂长期摄入会引发头晕、嗜睡,并会出现停药反应,副作用明显[8]。因此,寻找安全、有效的PMDD治疗药物至关重要。

芦丁又称为芸香苷,属于黄酮类化合物,广泛存在于芸香、烟叶、枣、杏、橙皮、番茄、荞麦等植物中,具有抗炎、抗氧化、抗菌等功效[9]。本课题组前期研究发现,芦丁能够减少PMDD肝气逆证模型大鼠的攻击行为,改善PMDD肝气郁证模型大鼠的抑郁症状和学习记忆能力障碍[10－11],但具体机制尚不清楚。现有研究指出,芦丁可通过减轻神经元损伤来缓解抑郁症状[12],但PMDD与神经元损伤之间的关系以及芦丁能否通过减少神经元损伤来缓解PMDD肝气郁证尚未可知。基于此,本研究首先采用网络药理学和分子对接技术,预测芦丁保护神经元、缓解PMDD肝气郁证的潜在作用机制和关键靶点;再通过构建大鼠模型来评价芦丁对PMDD肝气郁证相关症状的改善作用,并初步验证潜在靶点及机制,以期为芦丁治疗PMDD肝气郁证提供药理学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括MK-Ⅱ型大鼠发情周期检测仪(日本Muromachi公司)、SuperMaze型动物行为采集分析系统(上海欣软信息科技有限公司)、7000smz-2型振动切片机(英国Campden公司)、BX53型正置荧光显微镜(日本Olympus公司)、SpectraMax i3x型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司)、FluorChem M型凝胶成像仪(美国ProteinSimple公司)等。

1.2 主要药品与试剂

芦丁对照品(批号B20771,纯度>98%)购自上海源叶生物科技有限公司;孕酮、雌二醇、苯甲酸雌二醇、戊巴比妥钠(批号分别为Y0001524、1250008、Y0000852、F20160721,纯度分别不低于99%、98%、98%、97%)均购自美国Sigma-Aldrich公司;盐酸氟西汀分散片[批号22533A,规格20 mg(以氟西汀计)]购自Patheon France公司;快速高尔基体染色试剂盒(批号PK401)购自美国FD NeuroTech公司;小鼠脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、兔抗β-微管蛋白(β-tubulin)抗体、辣根

过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号分别为EK0308、BM3877、BA1054）均购自武汉博士德生物工程有限公司；兔抗BDNF抗体（批号ab108319）购自英国Abcam公司；鼠抗突触核蛋白（synuclein，Syn）抗体、兔抗突触后密度蛋白95（postsynaptic density protein 95，PSD95）抗体、兔抗酪氨酸激酶受体B（tyrosine kinase receptor type B，TrkB）抗体（批号分别为2644、3450、4603）均购自美国CST公司。

1.3 实验动物

SPF级雌性未育Wistar大鼠60只，体重130～170 g，6～8周龄，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，生产许可证号为SCXK（京）2021-0006。所有大鼠随机分笼（每笼5只）并昼夜颠倒（每天晚上8:00开灯，早上8:00关灯）饲养，温度为22～26 ℃，相对湿度为40%～70%，自由摄食、饮水。本研究方案经山东第一医科大学附属中心医院实验动物福利伦理审查委员会批准（批准文号JNCHIACUC2021-79）。大鼠均适应性喂养7 d再进行后续实验。

2 方法与结果

2.1 网络药理学分析

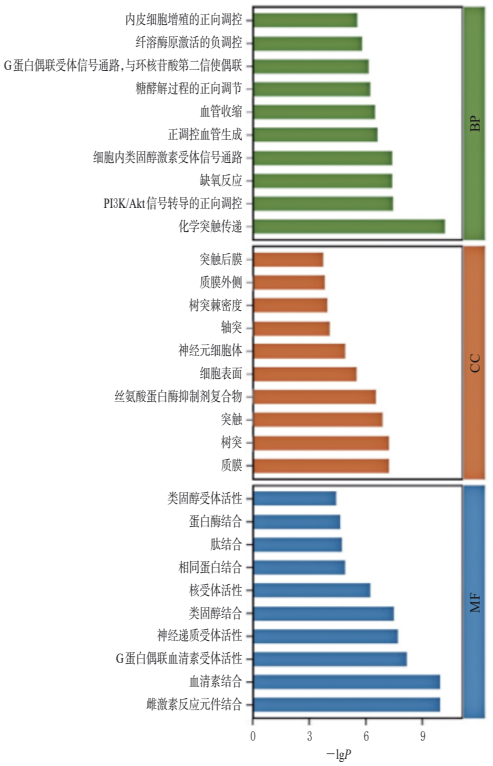
以“premenstrual dysphoric disorder”为关键词，检索GeneCards数据库（https://www.genecards.org/）、OMIM数据库（https://www.omim.org/）、TTD数据库（http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/），获得PMDD疾病靶点。通过SwissTargetPrediction数据库（http://www.swisstargetprediction.ch/）、Super-PRED数据库（https://prediction.charite.de/index.php）、SEA数据库（https://sea.bkslab.org/）、PharmMapper数据库（https://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html）、TargetNet数据库（http://targetnet.scbdd.com/）、DrugBank数据库（https://go.drugbank.com/）等获取芦丁的作用靶点。取上述疾病靶点和成分作用靶点，经UniProt数据库（https://www.uniprot.org/）转换为标准名称，再导入欧易云生信分析平台（https://cloud.oebiotech.com/）以获取交集靶点并绘制韦恩图。将交集靶点导入STRING数据库（https://string-db.org/），构建蛋白-蛋白相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络，隐藏网络中无关联的节点，导出“TSV”文件，并利用Cytoscape 3.10.1软件进行可视化展示。以节点度值来评估靶点的重要性，取度值排前5位以及与神经元损伤相关的靶点作为关键靶点。利用欧易云生信分析平台对交集靶点进行基因本体（gene ontology，GO）功能、京都基因和基因组数据库（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路富集分析。

结果显示，通过GeneCards、OMIM、TTD数据库获得PMDD疾病靶点1 410个；通过SwissTargetPrediction、Super-PRED、SEA、PharmMapper、TargetNet、DrugBank等数据库获得芦丁作用靶点844个；取交集获得PMDD和芦丁交集靶点60个。将上述交集靶点导入STRING数据库，所得PPI网络结果显示，肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）、单胺氧化酶A（monoamine oxidase A，MAOA）、TrkB、羟色胺受体2A（hydroxytryptamine receptor 2A，HTR2A）、BDNF是核心靶点（节点度值分别为72、65、58、58、56）；此外，神经损伤标志物PSD95、Syn在PPI网络中也较为重要（节点度值分别为26、12）。GO功能富集分析结果（图1A）显示，交集靶点的生物过程（biological process，BP）包括化学突触传递、内皮细胞增殖的正向调控等；细胞组分（cellular component，CC）主要涉及突触后膜、树突棘密度等；分子功能（molecular function，MF）主要涉及神经递质受体活性、类固醇结合等。KEGG通路富集分析结果（图1B）显示，钙信号通路、神经活性配体-受体相互作用、神经营养素信号通路、5-羟色胺能突触信号通路是交集靶点的主要富集通路。

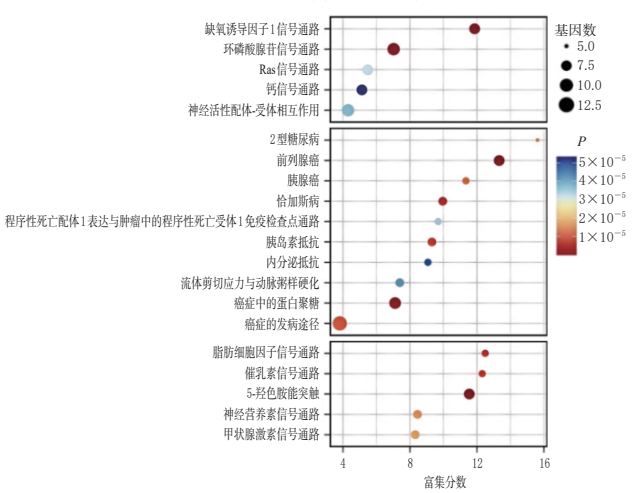
2.2 分子对接

根据网络药理学结果，本研究选取关键核心靶点TNF、BDNF、TrkB、MAOA、HTR2A和神经元损伤标志物Syn、PSD95进行分子对接验证，具体操作如下：从PDB数据库（https://www.rcsb.org）中获取关键靶点的蛋白模型，种属选择“人源”；采用Schrödinger Maestro 12.8软件的“Protein Preparation Wizard”板块对蛋白模型的结构进行优化，即对蛋白模型加氢并在优化液体模拟全原子势场4.0版力场下分配蛋白模型质子化状态和形式电荷。从PubChem数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）获取芦丁的小分子结构，使用Schrödinger Maestro 12.8软件的“LigPrep”板块对其进行结构优化，使用“Receptor Grid Generation”板块定义结合位点，格点的产生均保持默认设置。使用“标准精度打分模式”进行分子对接，对接得分越小表示亲和力越大、结合能力越强[13]。结果显示，Syn、BDNF、TrkB、PSD95、MAOA与芦丁的分子对接得分分别为－6.099、－5.936、－5.940、－5.887、－3.184 kcal/mol（1 kcal＝4.19 kJ），表明结合能力较强；而TNF、HTR2A与芦丁无结合位点。

综合网络药理学和分子对接结果可知，芦丁可以通过作用于核心靶点BDNF、TrkB和神经损伤标志物PSD95、Syn（结合能均小于－5 kcal/mol）来改善PMDD症状。



A. GO功能富集分析(前10位)



B. KEGG通路富集分析(前20位)

PI3K/Akt:磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B;Ras:大鼠肉瘤病毒癌基因同源物。

图1　芦丁-PMDD交集靶点的富集分析气泡图

2.3　动物实验验证

2.3.1　动情周期的人工诱导

雌性性成熟大鼠规律的动情周期一般为4 d,分为动情前期、动情期、动情后期、动情间期,其中动情前期、动情后期、动情间期又称非接受(non-receptive,NR)期,动情期又称接受(receptive,R)期[14]。由于每只大鼠所处的动情周期不完全一致,且动情周期规律性难以保证,故本研究通过手术摘除大鼠卵巢后统一进行人工激素诱导,以保证所有大鼠动情周期规律保持一致。

大鼠适应性饲养7 d后,予戊巴比妥钠麻醉后摘除卵巢。待大鼠恢复7 d,再进行激素诱导,具体诱导方法为:(1)NR期(动情后期)首日中午12:00,皮下注射0.012 5 μg/μL苯甲酸雌二醇0.04 mL;(2)NR期(动情间期)次日晚上8:00,皮下注射0.012 5 μg/μL雌二醇0.04 mL;(3)NR期(动情前期)第3天上午8:00,皮下注射0.012 5 μg/μL孕酮0.04 mL;(4)R期不进行任何干预。通过激素连续诱导2个动情周期,同时于每天下午1:00−3:00进行阴道电阻筛查(大鼠NR期的阴道电阻值<3 kΩ,R期的阴道电阻值≥3 kΩ[15]),当连续3 d出现NR期、1 d出现R期时,视为一个规律的周期。筛选至少连续2个动情周期规律的大鼠进行后续实验。

2.3.2　造模、分组与给药

将筛选所得大鼠分为正常组(n=10)和造模组(n=50)。采用择时束缚应激法构建PMDD肝气郁证大鼠模型,具体操作如下:于NR期,大鼠每天以束缚筒(管状塑料筒,长20 cm、直径6 cm)束缚5 h(下午2:00−7:00)。于束缚的第3个动情周期的动情间期和动情期进行强迫游泳实验和旷场实验,作为大鼠造模后NR期和R期的数据。将上述造模后NR期和R期强迫游泳悬浮不动时间的差值从小到大进行排序,剔除差值较小的前30%大鼠,其余大鼠视为PMDD肝气郁证模型构建成功[10],最终筛选出造模成功的大鼠36只。本研究将造模成功的大鼠随机分为模型组、氟西汀组(阳性对照)、芦丁组,每组12只。每天上午9:00,氟西汀组大鼠灌胃氟西汀2.7 mg/kg(以生理盐水为溶剂,为成人临床剂量的8倍)[15],芦丁组大鼠灌胃芦丁8.65 mg/kg(以生理盐水为溶剂)[11],正常组和模型组大鼠灌胃生理盐水,灌胃体积均为10 mL/kg。灌胃2个动情周期后进行行为学测试。灌胃期间除正常组外的其余各组大鼠均持续进行择时慢性束缚应激干预。

2.3.3　行为学测试

分别在动情周期的NR、R期进行行为学评价。在开始给药的第3个动情周期的动情间期和动情期给药1 h后进行旷场实验、强迫游泳实验和Y迷宫实验。每只大鼠测试前均进行阴道电阻测试以确定其所处周期。

(1)旷场实验:旷场实验箱的长、宽、高分别为50、50、40 cm。将各组大鼠放置在旷场的中央区域,使用动物行为采集分析系统记录其6 min内的运动总距离、中央区域运动距离、中央区域停留时间。采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计分析;实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD-t检验;检验水准α=0.05(统计方法下同)。

(2)强迫游泳实验:强迫游泳实验装置为高50 cm、

直径20 cm的透明圆筒。旷场实验结束后，将大鼠放入加有（23±1）℃水的圆筒中，让其进行6 min的适应练习。正式实验时，使用动物行为采集分析系统记录其开始实验后2～6 min内的悬浮不动时间。

（3）Y迷宫实验：Y迷宫箱体由相邻夹角为120°的3个等长支臂组成。强迫游泳实验结束后，将大鼠置于Y迷宫任一支臂末端，使用动物行为采集分析系统记录其8 min内自由探索的视频图像，统计最大轮流次数、顺序轮流次数，并计算自发轮流行为得分：自发轮流行为得分＝顺序轮流次数/最大轮流次数×100%。

结果（表1）显示，在NR期和R期旷场实验中，各组大鼠的运动总距离、中央区域运动距离、中央区域停留时间比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。在NR期强迫游泳实验中，与正常组比较，模型组大鼠的悬浮不动时间显著延长（$P<0.05$）；与模型组比较，氟西汀组和芦丁组大鼠的悬浮不动时间均显著缩短（$P<0.05$）。在NR期Y迷宫实验中，与正常组比较，模型组大鼠的自发轮流行为得分显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，氟西汀组和芦丁组大鼠的自发轮流行为得分均显著升高（$P<0.05$）。在R期强迫游泳实验和Y迷宫实验中，各组大鼠相关指标比较的差异均无统计学意义（$P>0.05$）。

2.3.4　样本采集

行为学测试结束后，分别取正常组NR期和R期大鼠5只，取模型组、氟西汀组、芦丁组NR期和R期大鼠6只，予戊巴比妥钠麻醉后于腹主动脉采血5 mL。血样静置30 min后，于4 ℃下以3 000 r/min离心15 min，取上层血清，于－80 ℃下保存，备检。采血后，迅速将大鼠断头处死，在冰上钝性分离其全脑和海马组织，进行高尔基染色；脑海马组织称重后，于－80 ℃下保存，备检。

2.3.5　血清BDNF水平检测

采用ELISA法检测。取“2.3.4”项下各组NR、R期大鼠血清样品适量，参照相应试剂盒说明书操作，使用多功能酶标仪检测其血清BDNF水平。

结果（表2）显示，在NR期，与正常组比较，模型组大鼠的血清BDNF水平显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，芦丁组大鼠的血清BDNF水平显著升高（$P<0.05$），而氟西汀组大鼠血清BDNF水平无显著变化（$P>0.05$）。在R期，各组大鼠血清BDNF水平比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.3.6　神经元形态观察与相关指标检测

采用高尔基染色法观察。取“2.3.4”项下各组NR、R期大鼠脑组织，洗去表面血液后浸泡于4%多聚甲醛溶液，固定24 h后，将脑组织置于高尔基染色液中避光染色14 d，浸泡48 h后转移至新的高尔基染色液中，之后每3 d更换1次染色液；取出脑组织，依次进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明；脱水后使用振动切片机切取100 μm厚的切片，以甘油明胶封片。使用光学显微镜观察其脑海马组织神经元形态并拍照（神经元呈黑褐色）。采用Image J软件统计神经元树突棘数量和树突长度，并计算平均每10 μm树突上的树突棘密度。

结果（表2、图2）显示，在NR期，与正常组比较，模型组大鼠脑海马组织神经元突触结构减少，树突棘密度显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，氟西汀组和芦丁组大鼠脑海马组织神经元突触结构增多，树突棘密度均显著升高（$P<0.05$）。在R期，各组大鼠脑海马组织神经元突触结构相似，其树突棘密度比较的差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.3.7　相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.3.4”项下各组NR、R期大鼠冻存的脑海马组织适量，匀浆后离心，取上清液；以BCA法测定蛋白浓度后作变性处理。取变性蛋白，经电泳分离后转膜，以封闭液于室温下封闭2 h；用TBST洗膜30 min后，分别加入BDNF、PSD95、Syn、TrkB、β-tubulin一抗（稀释度分别为1∶1 000、1∶2 000、1∶2 000、1∶2 000、1∶2 000），于4 ℃下孵育过夜；用TBST洗膜30 min后，加入相应二抗（稀释度均为1∶5 000），于室温下孵育2 h；显色后，于凝胶成像仪下曝光、显影。使用Image J软件，以目的蛋白与内参蛋白（β-tubulin）的条带灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量。

结果（表3、图3）显示，在NR期，与正常组比较，模型组大鼠脑海马组织中BDNF、Syn、TrkB蛋白的表达均显著下调（$P<0.05$）；与模型组比较，氟西汀组和芦丁组

表1　各组大鼠行为学评价指标比较（$\bar{x}\pm s$）

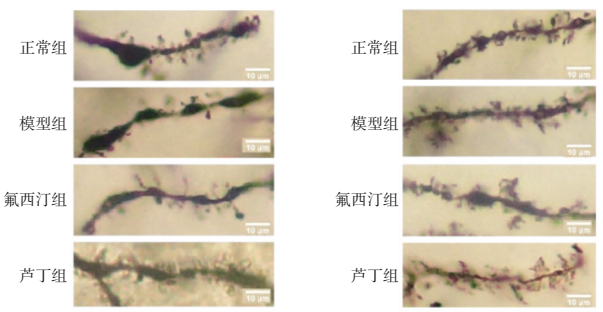
组别	n	运动总距离/m		中央区域运动距离/m		中央区域停留时间/s		悬浮不动时间/s		自发轮流行为得分/%	
		NR期	R期	NR期	R期	NR期	R期	NR期	R期	NR期	R期
正常组	10	26.06±4.09	31.87±3.08	2.13±0.49	2.41±0.46	7.76±2.22	8.99±1.81	13.40±3.88	12.34±3.29	64.40±2.22	51.50±3.24
模型组	12	30.15±4.69	34.95±4.78	1.64±0.71	3.28±0.72	5.54±1.36	10.35±4.28	29.92±5.39[a]	11.74±3.07	53.24±2.41[a]	51.66±2.74
氟西汀组	12	25.63±4.52	26.53±4.41	2.16±0.52	2.01±0.12	9.89±0.15	9.87±3.43	15.15±3.33[b]	14.18±4.12	68.46±4.33[b]	53.75±4.18
芦丁组	12	29.46±4.91	32.27±2.68	3.16±0.15	2.80±0.47	17.61±10.36	12.41±2.39	13.48±2.61[b]	12.37±3.71	66.26±3.28[b]	53.13±4.05

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

表2　各组大鼠血清BDNF水平和脑海马组织树突棘密度比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	BDNF/（pg/mL）		树突棘密度/（个/10 μm）	
		NR期	R期	NR期	R期
正常组	5	1 650.4±261.6	1 395.2±113.3	0.589 6±0.031 7	0.542 7±0.085 4
模型组	6	1 108.2±290.7[a]	1 326.4±141.8	0.222 4±0.019 1[a]	0.345 5±0.155 7
氟西汀组	6	1 405.1±346.8	1 451.2±101.5	0.543 8±0.035 4[b]	0.429 0±0.095 6
芦丁组	6	1 634.0±360.8[b]	1 483.1±242.1	0.383 0±0.023 6[b]	0.357 4±0.137 9

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。



A. NR期　　B. R期

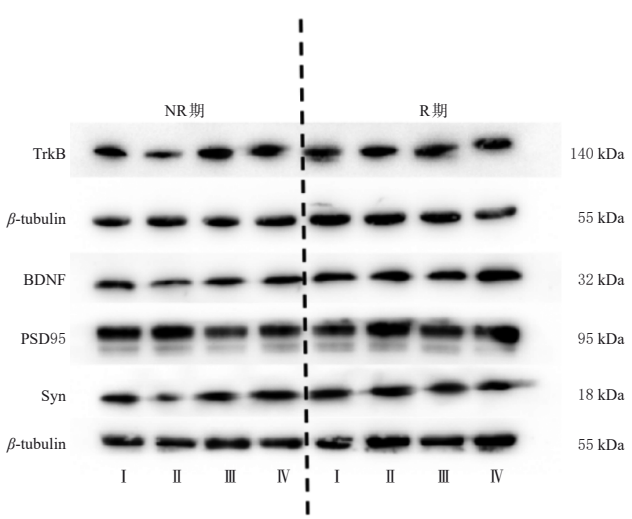
图2　各组大鼠NR、R期脑海马组织高尔基染色显微图（标尺：10 μm）

大鼠脑海马组织中BDNF、Syn、TrkB蛋白的表达均显著上调（$P<0.05$）；而各组PSD95蛋白的表达比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。在R期，各组大鼠上述蛋白的表达比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。

表3　各组大鼠脑海马组织中相关蛋白的相对表达量比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	BDNF/β-tubulin		PSD95/β-tubulin		Syn/β-tubulin		TrkB/β-tubulin	
		NR期	R期	NR期	R期	NR期	R期	NR期	R期
正常组	5	1.33±0.49	1.26±0.83	0.82±0.34	1.20±0.42	1.26±0.48	0.98±0.23	1.63±0.34	1.17±0.33
模型组	6	0.59±0.17[a]	0.87±0.13	0.88±0.23	1.22±0.25	0.46±0.14[a]	0.81±0.35	0.84±0.05[a]	1.12±0.31
氟西汀组	6	1.31±0.50[b]	1.00±0.27	1.03±0.33	0.74±0.13	1.41±0.73[b]	0.75±0.29	1.41±0.44[b]	1.10±0.13
芦丁组	6	1.27±0.43[b]	1.41±0.62	0.87±0.20	1.14±0.32	1.30±0.60[b]	0.72±0.15	1.44±0.36[b]	1.09±0.55

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。



Ⅰ：正常组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：氟西汀组；Ⅳ：芦丁组。

图3　各组大鼠脑海马组织中相关蛋白表达的电泳图

3　讨论

PMDD特发于育龄期女性。随着社会节奏的加快，其发病率呈现逐年升高的趋势，严重影响育龄期女性的身心健康及家庭关系[1]，故研究其病因病机及对症治疗具有重要意义。目前，PMDD的治疗手段有限、安全性不佳、患者接受度低，故寻找新的治疗策略尤为关键。为此，本研究在网络药理学、分子对接研究的基础上，以大鼠为实验对象，初步探讨了芦丁对PMDD肝气郁证的干预作用及潜在机制，为该病的治疗提供了参考。

3.1　PMDD肝气郁证大鼠模型的构建

本研究首先通过手术摘除大鼠双侧卵巢+人工注射激素诱导大鼠形成稳定且规律的动情周期，再结合择时束缚应激制备了PMDD肝气郁证大鼠模型。随后，本研究利用旷场实验、强迫游泳实验和Y迷宫实验评价了NR、R期大鼠的行为学表现，结果显示，模型大鼠的抑郁样行为在NR期出现，在R期消失，符合PMDD肝气郁证躯体和行为症状的发作规律，表明造模成功。经芦丁干预后，PMDD肝气郁证模型大鼠在NR期的悬浮不动时间显著缩短，自发轮流行为得分显著升高，表明其对PMDD肝气郁证模型大鼠的抑郁症状和空间记忆能力障碍有明显的改善作用。

3.2　PMDD肝气郁证的发病机制与海马神经元损伤有关

研究显示，PMDD的发生伴随着神经功能异常及脑区病理改变，主要表现为海马、杏仁核、前额叶等脑区结构的改变[16-17]。与健康者比较，PMDD患者的海马皮质密度明显增加，而海马旁皮质密度明显降低[18]。上述研究提供了PMDD发生与神经损伤有关的线索。本研究结合网络药理学和分子对接分析发现，芦丁可能作用于BDNF、TrkB、PSD95、Syn等靶点，从而缓解PMDD症状。行为学测试结果显示，NR期PMDD肝气郁证模型大鼠出现了抑郁症状，且空间记忆能力较正常大鼠明显减弱；进一步的高尔基染色结果显示，PMDD肝气郁证模型大鼠脑海马组织神经元突触结构减少，树突棘密度较正常大鼠显著降低。经芦丁干预后，上述指标均得以好转。而R期各组大鼠上述指标均未出现明显改变。

3.3　芦丁可通过调控BDNF/TrkB信号通路缓解海马神经元损伤

BDNF/TrkB信号通路能够调控神经元凋亡、支持神经元生长以及调控突触功能等。研究指出，BDNF可通过与TrkB结合而激活下游PI3K/Akt、Ras/促分裂原活化的蛋白激酶信号通路，从而抑制神经元细胞的凋亡、促进轴突和树突的生长[19-20]。BDNF或TrkB表达下调后，

大鼠会出现空间记忆缺陷，海马组织CA1、CA3区树突形态改变、树突棘密度降低[21]。Syn与突触功能、学习记忆能力密切相关，敲除其编码基因会致学习记忆障碍，上调其表达能改善抑郁样行为[22]。研究指出，经BDNF/TrkB信号通路激活的PI3K/Akt、Ras信号通路可促进Syn mRNA的表达，BDNF/TrkB信号通路还可增强神经元膜的稳定性和流动性，进而有助于Syn与膜的结合，维持突触正常功能[23]。本研究结果显示，芦丁可增加NR期PMDD肝气郁证模型大鼠血清中BDNF水平并上调脑海马组织中BDNF、TrkB、Syn蛋白的表达，但以上指标在R期均无明显变化。

研究指出，BDNF与PMDD的发生密切相关。BDNF能够调控5-羟色胺的合成、释放与再摄取[13]。PMDD患者的抑郁、焦虑等情绪症状与5-羟色胺水平显著相关。临床研究显示，PMDD患者黄体期的血清BDNF水平明显降低[24]。本研究结果也支持这一观点，即PMDD肝气郁证模型大鼠NR期的血清BDNF水平较正常大鼠显著降低，而芦丁可使其血清BDNF水平恢复正常；此外，大鼠R期血清BDNF水平未出现异常。研究指出，BDNF能促进突触形成，增强神经可塑性[25]。本研究结果显示，PMDD肝气郁证模型大鼠脑海马组织神经元树突棘密度较正常大鼠显著降低，提示神经元发生损伤；而芦丁可回调其树突棘密度，缓解神经元损伤。可见，芦丁上述作用的发挥可能与在NR期激活BDNF/TrkB信号通路、促进Syn蛋白表达有关。

PSD95可控制突触的传递和可塑性，其表达增加可缓解长期抑郁症状[26]。研究发现，BDNF/TrkB信号通路可通过激活下游转录因子环磷酸腺苷反应元件结合蛋白来促进PSD95的表达；该通路还能增强PSD95和*N*-甲基-D-天冬氨酸受体的相互作用，从而促进突触可塑性的形成[27]。但本研究结果显示，芦丁对于PSD95蛋白的表达无明显影响。研究指出，重度抑郁症患者相关区域PSD95和Syn水平均明显降低，药物可通过激活BDNF/TrkB信号通路来调节上述蛋白的合成，增加其表达[28]；也有研究指出，认知障碍模型大鼠和慢性强迫游泳应激大鼠海马组织中PSD95的含量明显升高[29－30]。可见，PSD95的表达与抑郁等疾病的关系较为复杂。笔者结合本研究结果推测，芦丁可能通过激活BDNF/TrkB信号通路影响Syn而非PSD95蛋白的表达，从而发挥改善PMDD肝气郁证的作用。

综上所述，芦丁可缓解PMDD肝气郁证模型大鼠的抑郁症状，增强其空间记忆能力，减少神经元损伤，上述作用可能与该成分激活BDNF/TrkB信号通路、上调Syn蛋白的表达有关。但本研究存在一定局限性，缺少芦丁作用于BDNF/TrkB信号通路的深入验证，后续还需增加BDNF/TrkB信号通路抑制剂，以进一步验证芦丁的作用机制。

参考文献

[1] ITRIYEVA K. Premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder in adolescents[J]. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care，2022，52(5)：101187.

[2] HANTSOO L，NEILL EPPERSON C. Premenstrual dysphoric disorder：epidemiology and treatment[J]. Curr Psychiatry Rep，2015，17(11)：87.

[3] NAIK S S，NIDHI Y，KUMAR K，et al. Diagnostic validity of premenstrual dysphoric disorder：revisited[J]. Front Glob Womens Health，2023，4：1181583.

[4] QIAO M Q，SUN P，WANG H J，et al. Epidemiological distribution and subtype analysis of premenstrual dysphoric disorder syndromes and symptoms based on TCM theories[J]. Biomed Res Int，2017，2017：4595016.

[5] 李亚琼，胡明会，魏盛，等. PMS/PMDD发病机制研究进展[J]. 医学研究杂志，2018，47(10)：166-169.

[6] LOPEZ L M，KAPTEIN A A，HELMERHORST F M. Oral contraceptives containing drospirenone for premenstrual syndrome[J]. Cochrane Database Syst Rev，2012(2)：CD006586.

[7] HOFMEISTER S，BODDEN S. Premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder[J]. Am Fam Physician，2016，94(3)：236-240.

[8] LOCHMANN D，RICHARDSON T. Selective serotonin reuptake inhibitors[J]. Handb Exp Pharmacol，2019，250：135-144.

[9] JI Y L，MA Y Y，MA Y M，et al. Rutin prevents pyroptosis and M1 microglia via Nrf2/Mac-1/caspase-1-mediated inflammasome axis to improve POCD[J]. Int Immunopharmacol，2024，127：111290.

[10] 张长龙，马明钰，李阳，等. 丹皮酚和芦丁对经前烦躁障碍症肝气逆证大鼠行为、卵巢激素和神经递质的影响[J]. 山东中医药大学学报，2022，46(4)：508-515.

[11] WANG X J，XIA X W，SONG X L，et al. Therapeutic potential of rutin in premenstrual depression：evidence from *in vivo* and *in vitro* studies[J]. Front Pharmacol，2025，15：1525753.

[12] ANJOMSHOA M，BOROUJENI S N，GHASEMI S，et al. Rutin via increase in the CA3 diameter of the hippocampus exerted antidepressant-like effect in mouse model of maternal separation stress：possible involvement of

NMDA receptors[J]. Behav Neurol，2020，2020：4813616.
[13] 吕鑫，顾志荣，张志红，等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨解毒活血汤治疗新型冠状病毒肺炎的潜在作用机制[J]. 甘肃中医药大学学报，2022，39(4)：34-44.
[14] JIANG H，YIN H，WANG L，et al. Memory impairment of chewing-side preference mice is associated with 5-HT-BDNF signal pathway[J]. Mol Cell Biochem，2021，476(1)：303-310.
[15] 侯金良. 择时慢性束缚应激诱导PMDD肝气郁证大鼠模型效度估计及舒郁胶囊干预机制初探[D]. 济南：山东中医药大学，2013.
[16] 李淑静，孟辰，高莹莹，等. 基于影像学的PMS/PMDD脑病理研究进展[J]. 中国临床解剖学杂志，2022，40(3)：372-375.
[17] 张清萍，赖梓焱，赖茵圻，等. 经前期焦虑障碍的脑磁共振成像研究进展[J]. 临床放射学杂志，2022，41(4)：772-775.
[18] JEONG H G，HAM B J，YEO H B，et al. Gray matter abnormalities in patients with premenstrual dysphoric disorder：an optimized voxel-based morphometry[J]. J Affect Disord，2012，140(3)：260-267.
[19] LI Y，XIANG L L，WANG C，et al. Protection against acute cerebral ischemia/reperfusion injury by Leonuri Herba total alkali via modulation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway in rats[J]. Biomed Pharmacother，2021，133：111021.
[20] ISMAIL T R，YAP C G，NAIDU R，et al. Environmental enrichment and the combined interventions of EE and metformin enhance hippocampal neuron survival and hippocampal-dependent memory in type 2 diabetic rats under stress through the BDNF-TrkB signaling pathways[J]. Biomed Pharmacother，2024，175：116729.
[21] WANG Y J，LIANG J，XU B Y，et al. TrkB/BDNF signaling pathway and its small molecular agonists in CNS injury[J]. Life Sci，2024，336：122282.
[22] MARTÍN E D，GONZÁLEZ-GARCÍA C，MILÁN M，et al. Stressor-related impairment of synaptic transmission in hippocampal slices from alpha-synuclein knockout mice [J]. Eur J Neurosci，2004，20(11)：3085-3091.
[23] WU Y H，ZHU Z P，LAN T，et al. Levomilnacipran improves lipopolysaccharide-induced dysregulation of synaptic plasticity and depression-like behaviors via activating BDNF/TrkB mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Mol Neurobiol，2024，61(7)：4102-4115.
[24] ORAL E，KIRKAN T S，YILDIRIM A，et al. Serum brain-derived neurotrophic factor differences between the luteal and follicular phases in premenstrual dysphoric disorder [J]. Gen Hosp Psychiatry，2015，37(3)：266-272.
[25] LEAL G，COMPRIDO D，DUARTE C B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity[J]. Neuropharmacology，2014，76 Pt C：639-656.
[26] WANG J P，TU Q F，ZHANG S M，et al. Kif15 deficiency contributes to depression-like behavior in mice[J]. Metab Brain Dis，2023，38(7)：2369-2381.
[27] YANG P，CHEN H Y，WANG T，et al. Electroacupuncture promotes synaptic plasticity in rats with chronic inflammatory pain-related depression by upregulating BDNF/TrkB/CREB signaling pathway[J]. Brain Behav，2023，13(12)：e3310.
[28] VON BOHLEN UND HALBACH O，VON BOHLEN UND HALBACH V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function[J]. Cell Tissue Res，2018，373(3)：729-741.
[29] 叶海森，陈曦，李韧娇，等. 养血清脑颗粒对认知功能障碍大鼠学习、记忆及GAP-43、PSD-95表达的影响[J]. 世界中医药，2020，15(7)：1021-1024.
[30] 林贤浩，郑金炽. 慢性强迫游泳对大鼠行为及其脑内突触后致密蛋白95含量的影响[J]. 首都医科大学学报，2011，32(6)：820-824.

（收稿日期：2025-01-06　修回日期：2025-05-10）
（编辑：舒安琴）