

滋水清肝饮对脂多糖诱导的抑郁小鼠的改善作用及对ERK/NF- κ B通路的影响

韩朝军¹, 袁诗宇², 曹珊珊¹, 汪 丹¹, 史磊磊¹, 刘继平^{1,3}, 史永恒^{1*}

1. 陕西中医药大学 药学院, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西中医药大学附属第二医院 药剂科, 陕西 咸阳 712046

3. 陕西省中医药管理局 中药药效机制与物质基础重点实验室, 陕西 咸阳 712046

摘要: 目的 探讨滋水清肝饮在应用脂多糖(LPS)制备的小鼠抑郁模型中的抗抑郁作用和潜在机制。方法 选取60只小鼠按随机数字表随机分为6组: 对照组、模型组、盐酸氟西汀组(阳性药, 10 mg·kg⁻¹)和滋水清肝饮低、中、高剂量(8.835、17.670、35.340 g·kg⁻¹)组, 给药14 d后, 除对照组ip等量0.9%的氯化钠溶液外, 其余各组均ip LPS(0.83 mg·kg⁻¹), LPS注射结束24 h后, 称小鼠质量, 并进行悬尾实验和强迫游泳实验; 通过苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠海马形态学改变; 免疫荧光染色检测海马小胶质细胞标志物离子化钙结合适配分子1(Iba-1)荧光强度; 试剂盒法检测小鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、5-羟色胺(5-HT)水平及小鼠海马吲哚胺2, 3-双加氧酶1(IDO1)、犬尿氨酸(KYN)、5-HT水平; Western blotting法检测小鼠海马组织中p-核因子 κ B(NF- κ B)、p-细胞外调节蛋白激酶(ERK)蛋白表达。结果 与模型组相比, 滋水清肝饮组小鼠体质量均有所回升($P<0.05$); 各给药组小鼠的悬尾实验和强迫游泳实验不动时间显著缩短($P<0.05, 0.01$); 各给药组海马形态学转好, 海马小胶质细胞标志物Iba-1表达显著降低($P<0.05$); 滋水清肝饮中、高剂量组和盐酸氟西汀组小鼠血清中的5-HT水平显著增加($P<0.05$), 各给药组血清SOD活力显著增强($P<0.05$), 血清TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MDA水平显著降低($P<0.05, 0.01$); 各给药组小鼠海马中IDO1、KYN水平显著下降($P<0.05, 0.01$), 滋水清肝饮中、高剂量组和盐酸氟西汀组海马中5-HT水平显著上升($P<0.05, 0.01$); 各给药组海马组织中p-ERK、p-NF- κ B蛋白表达显著降低($P<0.05, 0.01$)。结论 滋水清肝饮显著改善急性LPS小鼠的抑郁样行为, 其机制可能与抑制ERK/NF- κ B通路、降低IDO1水平、改善神经炎症有关。

关键词: 滋水清肝饮; 抑郁症; 脂多糖; 吲哚胺2, 3-双加氧酶1(IDO1); 5-羟色胺(5-HT); ERK/NF- κ B信号通路

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2024)05-1042-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.05.014

Ameliorating effect of Zishui Qinggan Yin on lipopolysaccharide-induced depressed mice and its effect on ERK/NF- κ B pathway

HAN Chaojun¹, YUAN Shiyu², CAO Shanshan¹, WANG Dan¹, SHI Leilei¹, LIU Jiping^{1,3}, SHI Yongheng¹

1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. Department of pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

3. Key Laboratory of Pharmacodynamics and Material Basis of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, Xianyang, Xianyang 712046, China

Abstract: **Objective** The aim of this study was to investigate the antidepressant effect and potential mechanism of Zishui Qinggan Yin (ZSQGY) in the LPS-induced depression mice model. **Methods** A mouse depression model was established by LPS. A total of 60 mice were randomly selected and randomly divided into six groups according to the random number table, namely control group, model group, Flu group (10 mg·kg⁻¹), ZSQGY low, medium and high dose (8.835, 17.670, 35.340 g·kg⁻¹) groups. After 14 days of administration, the control group was injected with the same amount of normal saline. The other groups were ip injected with LPS

收稿日期: 2024-01-30

基金项目: 陕西省陕西中医药大学校级科研课题项目(2021GP25); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2022JQ-918); 国家自然科学基金项目(82304504)

第一作者: 韩朝军, 男, 讲师, 博士, 从事中药神经药理学研究。E-mail: hanchaojun@sntcm.edu.cn

*通信作者: 史永恒, 男, 副教授, 博士, 从事中药神经药理学研究。Tel: 18291497169 E-mail: yhshi@sntcm.edu.cn

(0.83 mg·kg⁻¹). After 24 h LPS injection, mice are weighed and the tail suspension test and forced swimming test were performed. The morphological changes of mice hippocampus were observed by HE staining and Nishi staining, and immunofluorescence staining was used to detect the fluorescence intensity of hippocampal microglia marker Iba-1. The activity of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in serum of mice and the levels of IDO1, KYN, and 5-HT in the hippocampus of mice were detected by kits. The expression of p-NF- κ B, p-ERK, and ERK protein level in mouse hippocampus was detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, the body weight of mice in the ZSQGY group increased ($P < 0.05$). The immobility time in the tail suspension experiment and forced swimming experiment of mice in each treatment group was significantly shortened ($P < 0.05$, 0.01). The morphology of the hippocampus improved in each treatment group, and the expression of the hippocampal microglial cell marker Iba-1 was significantly reduced ($P < 0.05$). The levels of 5-HT in the serum of mice in the middle and high-dose groups of ZSQGY and the Flu group were significantly increased ($P < 0.05$), the activity of SOD in serum was significantly enhanced in each treatment group ($P < 0.05$), and the levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and MDA in serum were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). The levels of IDO1 and KYN in hippocampus were significantly decreased in each treatment group ($P < 0.05$, 0.01), the level of 5-HT in hippocampus was significantly increased in medium-dose and high-dose ZSQGY group and fluoxetine hydrochloride group ($P < 0.05$, 0.01). The protein expressions of p-ERK and p-NF- κ B in hippocampus were significantly decreased in each treatment group ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** ZSQGY can significantly improve the depression-like behavior in LPS-induced mice and the mechanism may be related to down-regulating ERK/NF- κ B signaling pathway and IDO1 level.

Key words: Zishui Qinggan Yin; depression; lipopolysaccharide (LPS); indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO1); 5-hydroxytryptamine (5-HT); ERK/NF- κ B signaling pathway

抑郁症是一种以情绪低落为特征的精神疾病,临床表现包括精力不足、思维迟钝、言语和运动减少、失去兴趣或愉悦感,严重时还会出现自杀倾向,但确切发病机制尚不清楚^[1-2]。研究表明,免疫系统改变与抑郁症之间存在密切关联,在抑郁症患者血清及自杀后抑郁症患者大脑样本里均检测到炎症细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)等水平升高^[3-4]。免疫炎症通路激活,特别是促炎细胞因子的释放会引起神经内分泌和神经化学迭代,从而导致抑郁症^[5]。由此,神经炎症被认为是抑郁症的重要病因,也是抑郁症发病假说之一。

滋水清肝饮方源自清代高鼓峰所著《医宗己任编·四明心法》,书中记载:“疏肝益肾汤,凡胃脘痛,大便秘结者,肝血虚也,此方主之,逍遥散所不能愈者,此方妙。柴胡、白芍、熟地、山药、萸肉、丹皮、茯苓、泽泻,加归身、枣仁、山栀,名滋肾清肝饮”,具有滋肾养阴、清泻肝火之效。临床研究发现,滋水清肝饮能有效降低抑郁患者汉密尔顿抑郁量表评分,抑制患者血清中孤啡肽的水平,进而提高机体内5-羟色胺(5-HT)的表达,改善患者抑郁症状^[6],改善患者睡眠状况^[7],降低患者体内TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子水平等^[8]。研究也表明ip脂多糖(LPS)可导致急性炎症反应,进而引起小鼠抑郁样行为和认知改变^[9],可模拟炎症引发抑郁的模型^[10]。本实验采用急性LPS注射法建立抑郁小鼠模型,进一步研究经典名方滋水清肝饮防治抑郁症的作用和潜在

机制。

1 材料

1.1 动物

SPF级C57BL雄性6~8周小鼠60只,体重(20±2)g,购自成都达硕实验动物有限公司,动物生产许可证号为SCXK(川)2020-030。垫料和饲料均由成都达硕实验动物有限公司提供,饲养于陕西中医药大学动物房,并获陕西中医药大学动物伦理委员会批准(审查备案编号SUCMDL20210310006)。

1.2 药材来源

滋水清肝饮药材:柴胡6g、白芍10g、熟地黄10g、山药10g、山茱萸10g、牡丹皮10g、茯苓10g、泽泻10g、当归10g、酸枣仁10g、栀子10g,均购于陕西中医药大学附属医院,经陕西中医药大学药学院中药鉴定教研室颜永刚教授鉴定为正品,基原鉴定结果及产品信息汇总如下:伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC.的干燥根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根、玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.的新鲜或干燥块根的炮制加工品、薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb.的干燥根茎、山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.的干燥成熟果肉、毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.的干燥根皮、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf的干燥菌核、泽泻科植物泽泻 *Alisma plantago-aquatica* Linn.的干燥块茎、伞形科植物当归 *Angelica*

sinensis (Oliv.) Diels 的干燥根、鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子、茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 均符合《中国药典》2020年版一部相关规定。

1.3 药物及主要试剂

盐酸氟西汀(Flu, 批号 33323)购于 MCE 公司; 丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20210731)、总超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20210815)均购于南京建成生物工程研究所; TNF- α (批号 202109)、IL-1 β (批号 202109)、IL-6(批号 202109)、5-羟色胺(5-HT, 批号 202109)试剂盒, 5-HT(批号 202403)、吲哚胺 2, 3-双加氧酶 1(IDO1, 批号 202403)、犬尿氨酸(KYN, 批号 202403)ELISA 试剂盒均购于上海酶联生物科技有限公司; ERK1/2 (00115457)、p-ERK (00106696)、GAPDH (10017731)抗体购于 Proteintech 公司; p-NF- κ B 抗体(BB07114941)购于北京博奥森生物技术有限公司; 离子化钙结合适配分子 1(Iba-1)抗体(批号 GB113502-100)、羊抗小鼠抗体(BA1050)、羊抗兔抗体(BA1051)、超敏 ECL 化学发光液(AR1197)均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 主要仪器

EPOCH2NS 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); BSA224S 型分析电子天平(德国 Sartorius 公司); UPHW-II-90T 型纯水仪(成都超纯科技有限公司); 1-15K 型低温高速离心机(美国 Sigma 公司); Nikon Eclipse C1 型正置荧光显微镜(日本尼康)。

2 方法

2.1 滋水清肝饮药液制备

滋水清肝饮总方为 106 g, 按人与小鼠体表面积换算等效剂量为 17.670 g·kg⁻¹, 即中剂量, 同时设置低剂量为 8.835 g·kg⁻¹、高剂量为 35.340 g·kg⁻¹。方中饮片按上述剂量比, 加 10 倍量的水浸泡 40 min, 用煎药砂锅武火煮沸后转文火慢煎 1 h, 趁热滤过, 滤渣加 8 倍量水, 武火煮沸, 文火慢煎 40 min, 合并滤液, 浓缩至滋水清肝饮高剂量药液 1.7 g·mL⁻¹, 将浓缩液稀释 2 倍为中剂量药液, 稀释 4 倍为低剂量药液。滋水清肝饮方中, 山茱萸、山药为君药, 白芍、柴胡为臣药, 参照《中国药典》2020 年版一部相关规定, 经高效液相色谱仪测定高剂量药液中马钱苷、阿魏酸、芍药苷、柴胡皂苷 A 的含量分别为 (4.435±0.165)、(0.370±0.009)、(19.269±0.049)、(6.650±0.049)mg·mL⁻¹。

2.2 动物分组、造模及给药

小鼠适应性喂养 1 周, 采用随机数字表法进行分组, 共计 6 组, 每组 10 只, 分别为对照组、模型组、Flu(阳性药, 10 mg·kg⁻¹)^[11]组和滋水清肝饮低、中、高剂量(8.835、17.670、35.340 g·kg⁻¹)组, 每天 ig 给药 1 次, 对照组和模型组 ig 0.9% 氯化钠溶液。ig 2 周后^[12], 对照组 ip 0.9% 氯化钠溶液, 其余各组 ip LPS (0.83 mg·kg⁻¹)溶液^[10], ip 结束 24 h 后^[13], 对每只小鼠进行称质量以及行为学检测, 结束后处理取材。

2.3 行为学检测

2.3.1 悬尾实验 将小鼠倒挂在头部距离地面 20 cm 高度的装置上, 记录小鼠 6 min 的悬尾不动状态, 当小鼠表现为被动的悬挂且没有任何的肢体活动时被判定为不动, 用秒表计算出后 4 min 时间段内的累计不动时间。

2.3.2 强迫游泳实验 将小鼠放入高 24.5 cm, 直径为 16 cm 的高硼硅玻璃容器中, 容器中盛有 20 cm 高度的水, 且水温保持在 (23±2)°C, 视频记录小鼠在 6 min 的游泳不动状态, 当小鼠在容器中表现为没有明显的游泳动作时被认为漂浮不动, 用秒表计算出后 4 min 时间段内的累计不动时间。

2.4 小鼠海马染色

2.4.1 小鼠海马 HE 染色 取固定 24 h 以上的全脑组织样本, 制作石蜡切片, 片厚 4 μ m。石蜡切片脱水, 脱蜡, 苏木素染色 3~5 min, 自来水洗, 返蓝, 脱水, 伊红染色 5 min, 脱水, 透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察各组小鼠 CA1 区组织细胞形态变化。

2.4.2 小鼠海马免疫荧光染色检测 Iba-1 在脱蜡、水合和抗原修复后, 将海马切片固定在 4 °C 的 4% 多聚甲醛溶液中过夜, 然后在室温下用正常绵羊血清封闭 1 h, 加 Iba-1 (1:3 000) 抗体在 4 °C 孵育过夜, 加二抗。DAPI 复染细胞核, 淬灭组织自发荧光, 封片后镜检扫描, 观察海马 CA1 区小胶质细胞标志物 Iba-1 的表达。DAPI 为蓝色荧光, Iba-1 为绿色荧光。

2.5 小鼠血清及海马生化指标的检测

试剂盒法检测小鼠血清中 SOD 活性、MDA 及 5-HT 的水平, ELISA 法检测血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平及小鼠海马组织 5-HT、IDO1、KYN 的水平, 具体操作详见试剂盒说明书。

2.6 Western blotting 检测小鼠海马组织中 p-ERK、ERK、p-NF- κ B 蛋白表达

取小鼠一侧海马加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂后, 在低温冷冻研磨仪中充分研

磨,4℃离心取上清液,BCA蛋白定量后,等量蛋白上样,通过SDS-PAGE电泳分离,并转移至0.22 μm PVDF膜上,在TBST中清洗后在5%的脱脂牛奶中封闭1 h,分别加入按比例配好的一抗:p-NF-κB(1:1 000)、GAP(1:25 000),4℃过夜;TBST洗膜3次,每次10 min。加入二抗:山羊抗鼠、山羊抗兔室温孵育1 h;TBST洗膜3次,ECL化学发光显影,利用Image J计算目的蛋白的相对表达量。

2.7 统计学分析

采用SPSS 26.0统计学软件分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐的组间比较采用LSD方法,方差不齐组间比较采用Games-

Howell方法;不符合正态分布,多组间比较采用非参数检验。

3 结果

3.1 滋水清肝饮对LPS抑郁模型小鼠体质量和抑郁样行为的影响

经LPS注射24 h后,与对照组小鼠比较,模型组小鼠体质量显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,除Flu组外,其余小鼠体质量均显著回升($P < 0.05$)。悬尾实验及强迫游泳实验结果表明,与对照组比较,模型组小鼠行为学的不动时间明显延长($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠不动时间明显缩短($P < 0.05$ 、 0.01),见图1。

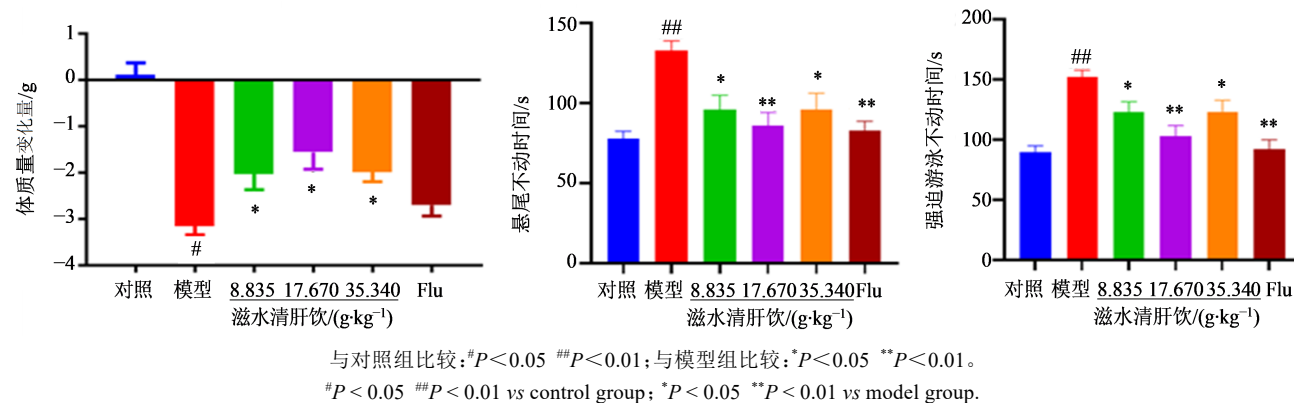


图1 滋水清肝饮对LPS抑郁模型小鼠体质量变化量(A)、悬尾实验不动时间(B)、强迫游泳实验不动时间(C)的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Effect of Zishui Qinggan Yin on weight change (A), suspended tail experiment immobility time (B), and forced swimming experiment immobility time (C) on LPS-induced depression model mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.2 滋水清肝饮对LPS抑郁模型小鼠海马神经细胞损伤的影响

3.2.1 滋水清肝饮对小鼠海马组织的影响 对照组小鼠海马神经细胞形态饱满,轮廓清晰。模型组细胞变形,且颜色被深染,轮廓模糊,结构形态较差(红色箭头)。与模型组相比,滋水清肝饮中、高剂量组有明显的改善,神经细胞的形态基本正常,有较少的核固缩现象;滋水清肝饮低剂量组及Flu组有部分神经细胞形态发生改变,结构形态发生改变。见图2。

3.2.2 滋水清肝饮对小鼠海马CA1区小胶质细胞的影响 小胶质细胞为绿色,细胞核为蓝色。与对照组相比,模型组海马组织中出现大量小胶质细胞增生,突起回缩,胞体增大,Iba-1荧光强度显著增加($P < 0.05$);与模型组相比,各给药组小胶质细胞标志物Iba-1显著减少($P < 0.05$)。见图3。

3.3 滋水清肝饮对LPS抑郁模型小鼠血清生化指标的影响

与对照组相比,模型组小鼠血清中的5-HT水平

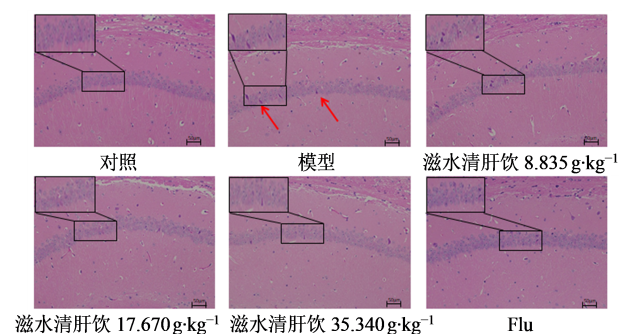
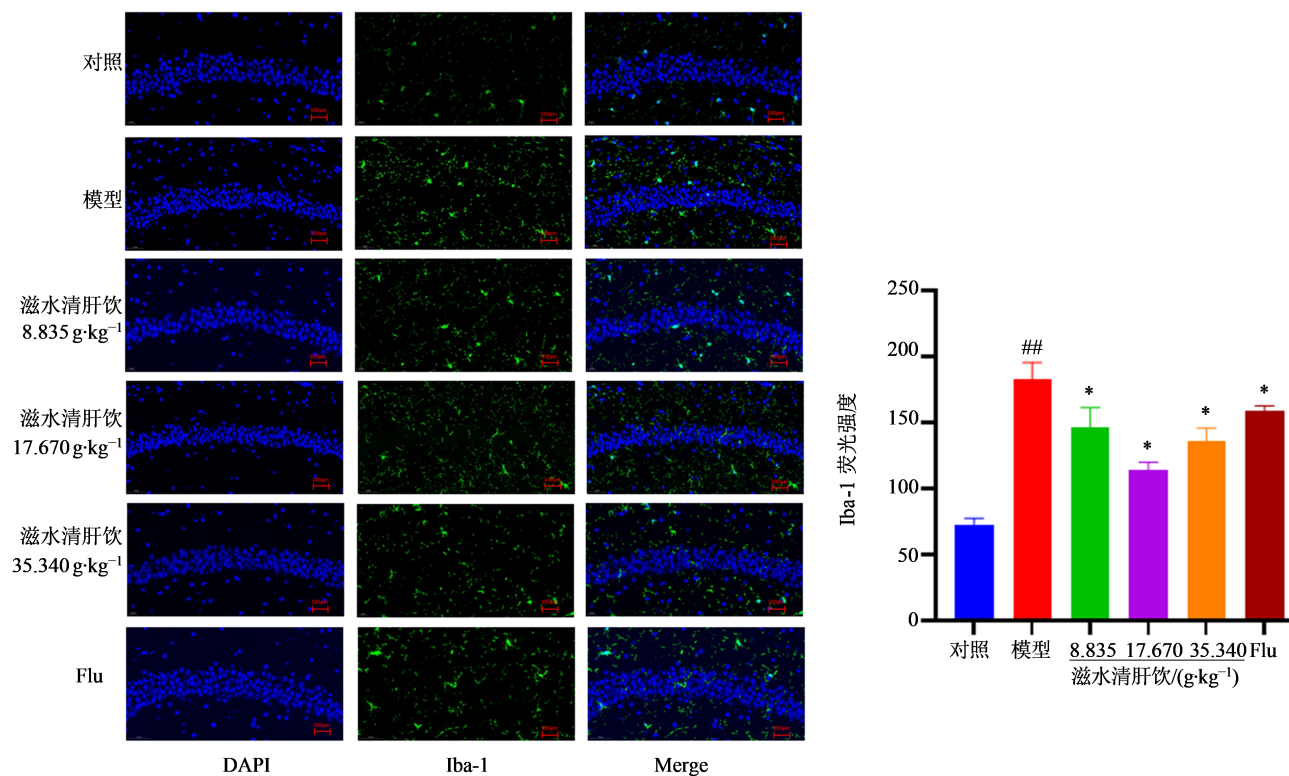


图2 滋水清肝饮对小鼠海马CA1区的影响(HE,×200)
Fig. 2 Effects of ZiShuiQingGanYin on CA1 region of hippocampus of mice (HE,×200)

降低($P < 0.05$),TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MDA水平升高($P < 0.01$),SOD活力显著减弱($P < 0.01$);与模型组相比,滋水清肝饮中、高剂量组和Flu组小鼠血清中的5-HT水平升高($P < 0.05$),各给药组SOD活力增强($P < 0.05$),各给药组TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MDA水平降低($P < 0.05$ 、 0.01)。见图4。

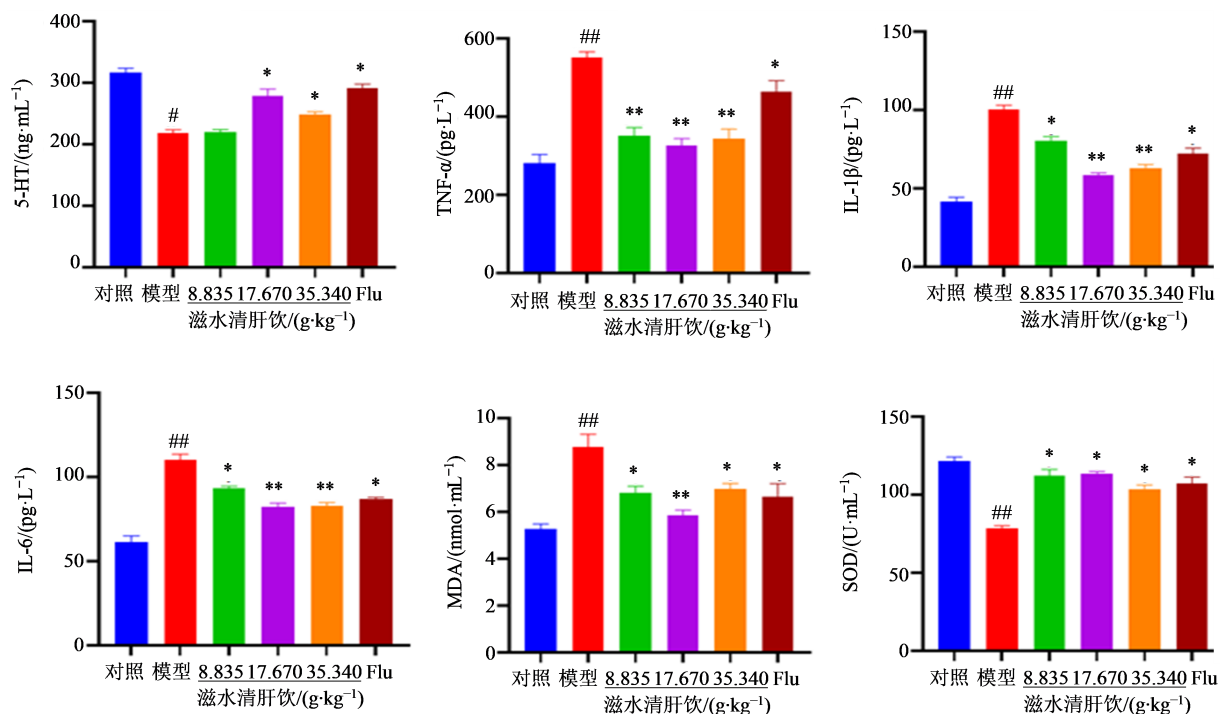


与对照组比较:^{##} $P < 0.01$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$ 。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group.

图 3 小鼠海马 CA1 区 Iba-1 表达 (免疫荧光, ×400)

Fig. 3 Expression of Iba-1 in hippocampus CA1 of mice (immunofluorescence, ×400)



与对照组比较:[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 4 小鼠血清生化指标 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 4 Contents of each factor in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

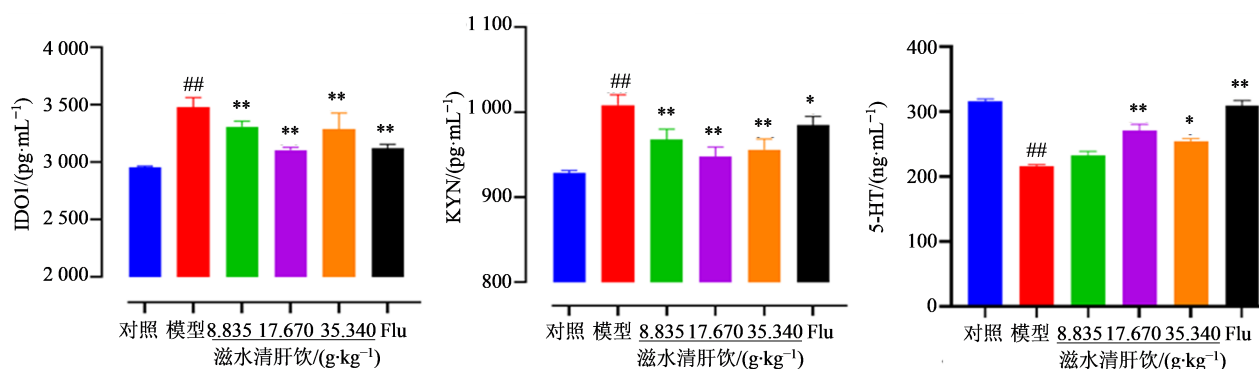
3.4 滋水清肝饮对LPS抑郁模型小鼠海马IDO1、KYN和5-HT水平的影响

与对照组相比,模型组小鼠海马IDO1、KYN水平显著升高($P<0.05$),5-HT水平显著下降($P<0.05$);与模型组相比,各给药组小鼠海马中IDO1、KYN水平显著下降($P<0.05$ 、 0.01),滋水清肝饮中、高剂量组和Flu组5-HT水平显著上升($P<$

0.05 、 0.01)。见图5。

3.5 Western blotting检测小鼠海马组织中p-NF- κ B、p-ERK蛋白的表达

如图6所示,与对照组相比,模型组小鼠海马中p-ERK/ERK、p-NF- κ B蛋白表达显著升高($P<0.05$ 、 0.01);与模型组相比,给药各组小鼠海马组织中p-ERK/ERK、p-NF- κ B蛋白表达显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。

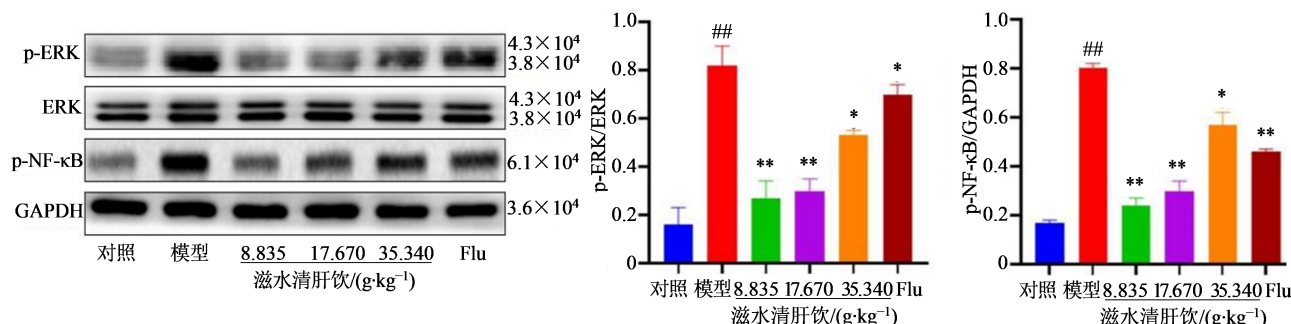


与对照组比较:## $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

$P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group.

图5 小鼠海马中IDO1、KYN、5-HT含量($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig. 5 IDO1, KYN and 5-HT in hippocampus in mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)



与对照组比较:## $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

$P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group.

图6 小鼠海马蛋白表达($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Expression of protein in hippocampus of mice($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

抑郁症,中医称为“郁证”,认为“情志抑郁,郁则不疏,不疏则运转不畅,均作肝木受病(肝脏升发不利)之征”^[14],《证治汇补》认为“郁病虽多,皆因气不周流,法当顺气为先”,肝主疏泄,为气机调节之枢纽。滋水清肝饮方中柴胡、当归、白芍可补肝血,舒肝气,酸枣仁养心阴、益肝血而宁心,诸药合用使得肝木调达,情志舒畅。临床上,滋水清肝饮可明显降低肝肾阴虚型轻度抑郁症患者的汉密尔顿抑郁量表评分(HAMD)和中医证候积分,降低患者体内TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子^[15]。本研究旨在建立动物模型,进一步探究其潜在抗抑郁作用机制。

抑郁症发病机制目前为止尚未完全阐明,神经炎症学说作为发病假说之一广受研究。LPS作为革兰阴性菌外膜的主要成分,会诱发机体免疫炎症反应,在中枢虽不影响细胞增殖,但可降低成年海马神经发生和存活率,且抑郁症的发展与海马结构的损伤二者联系最为密切^[16]。LPS作为细菌感染代表药物,小剂量给药不会引起休克样疾病但会导致时间依赖性行为的改变,LPS攻击机体后约2 h,血液中促炎细胞因子的释放达到峰值,疾病行为(例如发烧、厌食、运动和社交减少)在6 h内明显,而抑郁样行为在LPS给予后24 h被观察到^[10]。单一的全身性LPS免疫攻击被广泛用于诱导啮齿动物的抑

郁样状态,模仿急性传染病中发生的人类抑郁症状^[17]。动物体质量下降表明疾病状态,悬尾、强迫游泳实验的不动时间可评估抑郁的绝望行为,其越长表示生存意愿越低、绝望性越高。Flu作为选择性5-HT再摄取抑制剂类药物,增加5-HT水平,能明显改善抑郁小鼠抑郁样行为^[18],由此可作为阳性对照药。实验结果表明,在LPS造模24 h后,与对照组相比,模型组小鼠体质量下降显著,悬尾实验及强迫游泳实验不动时间明显增加;与模型组相比,给药组小鼠体质量出现回升,小鼠不动时间明显缩短,表明滋水清肝饮具有抗抑郁作用。

全身炎症和神经炎症被认为是神经退行性疾病和精神疾病发病机制的重要组成部分^[19]。小胶质细胞是中枢神经系统的常驻巨噬细胞,是大脑中免疫防御的第一道防线。在内部或外部刺激下激活的小胶质细胞产生并分泌细胞因子和其他炎症介质加速神经炎症反应,最终导致神经元变性和死亡^[20],其中海马易受到刺激进而使海马体积及细胞形态出现异常^[21]。实验结果表明,与对照组相比,模型组小鼠海马CA1区病理损伤严重,海马小胶质细胞标志物Iba-1表达增加,血清中MDA及TNF- α 、IL-1 β 等的水平升高,SOD活力降低;与模型组相比,各给药组小鼠海马CA1区损伤得到改善,海马小胶质细胞标志物Iba-1表达降低,血清中MDA及TNF- α 、IL-1 β 等的水平降低,SOD活力增强,表明滋水清肝饮具有一定抗炎作用。

LPS激活小胶质细胞的神经炎症涉及多种细胞信号通路,其中ERK/NF- κ B信号通路最为经典。NF- κ B信号通路在急慢性应激和LPS诱导的抑郁样行为中起重要作用,作为一种多效调节因子,参与炎症介质的调节、炎症细胞因子的转录和表达^[22],参与学习记忆、神经发生、神经元存活的调节^[23]。LPS激活小胶质细胞TLR受体,与下游信号级联反应,如丝裂原活化蛋白激酶家族(MAPKs)依次磷酸化后,最后激活转录因子NF- κ B,调节细胞生长分化、环境应激、炎症反应等过程^[24]。其中ERK是MAPKs的关键成员,其自身酪氨酸残基磷酸化后,可磷酸化NF- κ B ser536位点,促进其入核,增加其转录活性^[25-26],因此下调ERK/NF- κ B信号的传递是抑制炎症激活的重要方式之一。此外NF- κ B激活产生的炎症因子可活化吲哚胺2,3-双加氧酶系统。IDO1是参与色氨酸-犬尿氨酸(TRP-KYN)的代谢的重要限速酶。炎症持续激活的IDO1导致TRP-KYN通路过度活化,更多的TRP降解为KYN,TRP

的耗尽从而导致5-HT的合成不足^[27]。5-HT在抑郁症的发病机制中起关键作用,其通过5-HT受体的神经调节,与抑郁、焦虑密切相关^[28]。本研究显示滋水清肝饮可降低小鼠海马组织中LPS诱导的p-ERK表达,降低p-NF- κ B水平,减弱后者转录活性,降低了炎症因子水平,同时减少IDO1的蛋白表达,降低了色氨酸异常代谢产物KYN水平,增加体内5-HT含量,进而改善神经炎症导致的抑郁样行为。然而对于滋水清肝饮参与吲哚胺2,3-双加氧酶系统调控的机制,还需进一步研究。

本研究通过建立LPS诱导小鼠抑郁模型,经滋水清肝饮不同剂量干预,实验组小鼠抑郁样行为改善,海马形态学转好,海马小胶质细胞标志物Iba-1表达降低,KYN水平降低,5-HT水平升高,TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子和MDA水平降低,SOD活力增加,其潜在机制与滋水清肝饮抑制海马组织中ERK/NF- κ B通路激活、减少p-NF- κ B蛋白表达、降低IDO1水平、改善神经炎症对神经元损伤有关。提示滋水清肝饮具有一定的抗炎、抗抑郁作用,为抑郁症临床治疗的新策略提供了基础研究支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Beurel E, Toups M, Nemeroff C B. The bidirectional relationship of depression and inflammation: Double trouble [J]. *Neuron*, 2020, 107(2): 234-256.
- [2] Huang B S, Wu Y Y, Li C, et al. Molecular basis and mechanism of action of Albizia julibrissin in depression treatment and clinical application of its formulae [J]. *Chinese Herbal Medicines (CHM)*, 2023, 15(2): 201-213.
- [3] Köhler C A, Freitas T H, Maes M, et al. Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies [J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2017 May;135(5): 373-387.
- [4] 莫菁莲,陈思丹,符乃光,等.红景天苷介导TLR4调控小胶质细胞激活对小鼠抑郁样行为的改善作用[J].*药物评价研究*, 2021, 44(9): 1869-1875.
Mo J L, Chen S D, Fu N G, et al. Salidroside mediates TLR4 to regulate microglia activation and improves depression-like behavior in mice [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(9): 1869-1875.
- [5] Li W F, Ali T, He K W, et al. Ibrutinib alleviates LPS-induced neuroinflammation and synaptic defects in a mouse model of depression [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 92: 10-24.
- [6] 韩艳平. 滋水清肝饮对围绝经期抑郁症患者的临床疗

- 效及对血清孤啡肽和5-羟色胺的影响[J]. 中医临床研究, 2020, 12(12): 35-36.
- Han Y P. Clinical effect of Zishui Qinggan Decoction on patients with perimenopause depression and its effect on serum orphan enkephalin and 5-hydroxytryptamine [J]. Clin J Chin Med, 2020, 12(12): 35-36.
- [7] 杨春玲, 刘平夫, 黄岩. 滋水清肝饮加减辅治对肾虚肝旺证焦虑症患者心理生理学反应的影响[J]. 四川中医, 2022, 40(3): 172-175.
- Yang C L, Liu P F, Huang Y. Effect of modified Zishui Qinggan Decoction on psychological and physiological responses for patients with anxiety disorder of kidney-deficiency and liver-fire syndrome [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2022, 40(3): 172-175.
- [8] 任晓燕. 中医推拿联合滋水清肝饮治疗高血压(肾虚肝郁型)的效果观察[J]. 大医生, 2023, 8(22): 59-61.
- Ren X Y. Observation on the effect of traditional Chinese medicine massage combined with Zishui Qinggan Decoction on hypertension (kidney deficiency and liver depression type) [J]. Doctor, 2023, 8(22): 59-61.
- [9] Novakovic M M, Korshunov K S, Grant R A, et al. Astrocyte reactivity and inflammation-induced depression-like behaviors are regulated by Orail calcium channels [J]. Nat Commun, 2023, 14: 5500.
- [10] Walker A K, Wing E E, Banks W A, et al. Leucine competes with kynurenine for blood-to-brain transport and prevents lipopolysaccharide-induced depression-like behavior in mice [J]. Mol Psychiatry, 2019, 24: 1523-1532.
- [11] Duda W, Kubera M, Kreiner G, et al. Suppression of pro-inflammatory cytokine expression and lack of anti-depressant-like effect of fluoxetine in lipopolysaccharide-treated old female mice [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 48: 35-42.
- [12] 曹珊珊, 史磊磊, 张雨涵, 等. 滋水清肝饮对慢性束缚应激抑郁小鼠皮层ERK/CREB/BDNF通路及肠道菌群的影响[J]. 中草药, 2024, 55(2): 489-498.
- Cao S S, Shi L L, Zhang Y H, et al. Effect of Zishui Qinggan Yin on ERK/CREB/BDNF pathway and gut microbiota in chronic restraint stress depression mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(2): 489-498.
- [13] Yirmiya R, Pollak Y, Barak O, et al. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents [J]. Neuropsychopharmacology, 2001, 24(5): 531-544.
- [14] 李旭豪, 李金玲, 杨继国, 等. 近十年抑郁症的中医外治法研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(1): 28-33.
- Li X H, Li J L, Yang J G, et al. Research progress in the external treatment of depression in the past decade [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2023, 25(1): 28-33.
- [15] 王鑫鑫. 揸针联合滋水清肝饮治疗肝肾阴虚型轻度抑郁症的临床研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- Wang X X. Clinical study of treating mild depression of liver and kidney Yin deficiency with combination of acupuncture and Zishui Qinggan Yin [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2023.
- [16] Qu D, Ye Z C, Zhang W L, et al. Cyanidin chloride improves LPS-induced depression-like behavior in mice by ameliorating hippocampal inflammation and excitotoxicity [J]. ACS Chem Neurosci, 2022, 13(21): 3023-3033.
- [17] Zhao X N, Cao F R, Liu Q, et al. Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression [J]. Behav Brain Res, 2019, 364: 494-502.
- [18] Fang Y Q, Ding X, Zhang Y H, et al. Fluoxetine inhibited the activation of A1 reactive astrocyte in a mouse model of major depressive disorder through astrocytic 5-HT2BR/ β -arrestin2 pathway [J]. J Neuroinflam, 2022, 19(1): 23.
- [19] Medina-Rodriguez E M, Lowell J A, Worthen R J, et al. Involvement of innate and adaptive immune systems alterations in the pathophysiology and treatment of depression [J]. Front Neurosci, 2018, 12: 547.
- [20] Jia X N, Gao Z H, Hu H L. Microglia in depression: Current perspectives [J]. Sci China Life Sci, 2021, 64(6): 911-925.
- [21] Tai H H, Cha J, Vedaei F, et al. Treatment-specific hippocampal subfield volume changes with antidepressant medication or cognitive-behavior therapy in treatment-naive depression [J]. Front Psychiatry, 2021, 12: 718539.
- [22] Li Y J, Song W, Tong Y, et al. Isoliquiritin ameliorates depression by suppressing NLRP3-mediated pyroptosis via miRNA-27a/SYK/NF- κ B axis [J]. J Neuroinflam, 2021, 18(1): 1.
- [23] Sokołowska P, Seweryn Karbownik M, Józwiak-Bębenista M, et al. Antidepressant mechanisms of ketamine's action: NF- κ B in the spotlight [J]. Biochem Pharmacol, 2023, 218: 115918.
- [24] Trempolec N, Dave-Coll N, Nebreda A R. SnapShot: P38

- MAPK signaling [J]. Cell, 2013, 152(3): 656-656.e1.
- [25] Liu T, Zhang L Y, Joo D, et al. NF- κ B signaling in inflammation [J]. Signal Transduct Target Ther, 2017, 2: 17023.
- [26] Liu J, Qian C, Cao X T. Post-translational modification control of innate immunity [J]. Immunity, 2016, 45(1): 15-30.
- [27] Maes M, Mihaylova I, De Ruyter M, et al. The immune effects of TRYCATs (tryptophan catabolites along the IDO pathway): Relevance for depression - and other conditions characterized by tryptophan depletion induced by inflammation [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2007, 28(6): 826-831.
- [28] Jauhar S, Cowen P J, Browning M. Fifty years on: Serotonin and depression [J]. J Psychopharmacol, 2023, 37(3): 237-241.

【责任编辑 兰新新】