

• 药理与临床 •

基于外周血单个核细胞转录组学的柴归颗粒抗抑郁作用机制研究

王力文^{1,2,3}, 黄德华^{1,2,3}, 田俊生^{1,2,3}, 高晓霞^{1,2,3}, 秦雪梅^{1,2,3}, 杜冠华^{1,4}, 周玉枝^{1,2,3*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

4. 中国医学科学院, 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050

摘要: 目的 通过转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 技术分析柴归颗粒对慢性不可预知温和应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 模型大鼠外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 的转录组学特征, 并采用 qRT-PCR 法验证其作用机制。方法 将大鼠随机分为对照组、模型组、盐酸文拉法辛 (35 mg/kg) 组和柴归颗粒低、中、高剂量 (4.2、8.3、16.6 g/kg) 组, 造模同时给药, 连续 28 d。通过抑郁症传统药效学指标 (体质量、旷场实验、糖水偏爱实验及强迫游泳实验) 评价柴归颗粒的药效。采用 RNA-seq 技术对大鼠 PBMCs 进行转录组学分析, 筛选差异基因, 对其进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析; 通过 qRT-PCR 法对筛选出的关键表达基因进行实验验证。结果 行为学指标显示柴归颗粒能显著改善 CUMS 模型大鼠的抑郁行为。转录组学中 KEGG 通路富集分析表明抑郁发生时及柴归颗粒干预后, 都显著富集到嘌呤代谢通路, 因此针对嘌呤代谢相关代谢酶基因表达进行深入研究。qRT-PCR 结果表明, 与模型组比较, 柴归颗粒组大鼠 PBMCs 中的胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 3 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3, *Enpp3*)、胞质-5'-核苷酸酶 IIIA (cytosolic-5'-nucleotidase IIIA, *Nt5c3a*)、嘌呤核苷磷酸化酶 (purine nucleoside phosphorylase, *Pnp*)、腺苷酸脱氨酶 (adenosine deaminase, *Ada*) mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 黄嘌呤脱氢酶/氧化酶 (xanthine dehydrogenase/oxidase, *Xdh*)、嘌呤能受体 P2X7 (purinergic receptor P2X7, *P2rx7*)、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , *IL1 β*) mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 柴归颗粒具有抗抑郁作用, 其作用机制与调节嘌呤代谢途径上的基因及嘌呤能受体 P2X7 和炎症因子 *IL1 β* mRNA 表达有关。

关键词: 柴归颗粒; 慢性不可预知温和应激抑郁; 外周血单个核细胞; 转录组学; 嘌呤代谢

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)07-2031-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.012

Antidepressant mechanism of Chaigui Granules based on transcriptomics of peripheral blood mononuclear cells

WANG Li-wen^{1,2,3}, HUANG De-hua^{1,2,3}, TIAN Jun-sheng^{1,2,3}, GAO Xiao-xia^{1,2,3}, QIN Xue-mei^{1,2,3}, DU Guan-hua^{1,4}, ZHOU Yu-zhi^{1,2,3}

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. The Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. The Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in TCM of Shanxi Province, Taiyuan 030006, China

4. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To analyze the transcriptomic characteristics of Chaigui Granules (柴归颗粒) on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of rats with chronic unpredictable mild stress (CUMS) model by RNA sequencing (RNA-seq), qRT-PCR was used to

收稿日期: 2021-12-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074323); 国家自然科学基金资助项目 (81673572); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2017ZX09301047); 山西省留学回国人员科技活动择优资助项目 (201991); 山西省回国留学人员科研资助项目 (2020019)

作者简介: 王力文, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理作用机制研究。E-mail: 18434375989@163.com

*通信作者: 周玉枝, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: zhouyuzhi@sxu.edu.cn

verify the mechanism. **Methods** Rats were randomly divided into control group, model group, venlafaxine hydrochloride (35 mg/kg) group, and Chaigui Granules low-, medium- and high-dose (4.2, 8.3, 16.6 g/kg) groups. Rats were given drugs for 28 d while modeling. The efficacy of Chaigui Granules was evaluated through traditional pharmacodynamic indicators for depression (body weight, open field test, sugar water preference test and forced swimming test). RNA-seq technology was used to perform transcriptome sequencing analysis on rat PBMCs, screen for differential genes, and perform Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis; The key expressed genes screened out were verified experimentally by qRT-PCR. **Results** Behavioral indicators showed that Chaigui Granules significantly improved the depressive behavior of CUMS model rats. Enrichment analysis of KEGG pathway in transcriptomics showed that when depression occurs after the intervention of Chaigui Granules, purine metabolism pathway was significantly enriched. Therefore, in-depth research was conducted on gene expression of metabolic enzymes related to purine metabolism. qRT-PCR results showed that compared with model group, expression levels of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (*Enpp3*), cytosolic 5'-nucleotidase IIIA (*Nt5c3a*), purine nucleoside phosphorylase (*Pnp*) and adenosine deaminase (*Ada*) mRNA in PBMCs of Chaigui Granules group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), expression levels of xanthine dehydrogenase/oxidase (*Xdh*), purinergic receptor P2X7 (*P2rx7*), interleukin 1 β (*IL1 β*) mRNA were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Chaigui Granules has antidepressant effects, its mechanism is related to the regulation of genes in purine metabolism pathway, purinergic receptor P2X7 and inflammatory factor IL1 β .

Key words: Chaigui Granules; chronic unpredictable mild stress depression; peripheral blood mononuclear cells; transcriptomics; purine metabolism

根据世界卫生组织的数据,抑郁症是一种常见的精神障碍,影响着全球 3 亿多人口。抑郁症也是自杀的一个危险因素。2017 年,世界卫生组织宣布自杀是 15~29 岁年轻人的第 2 大死因,并预测抑郁症将是未来 10 年世界上最常见的精神疾病^[1]。临床抗抑郁药物以化学药为主,其优势在于起效较快,疗效确切,不足在于不良反应较大,患者对药物存在依赖性,复发率较高;而中药的药效稳定且不良反应少,安全性高。现代药理学研究表明,多种中药复方^[2-3]均有显著的抗抑郁作用。因此,从中药和天然药物中研究和开发新药,对抑郁症的治疗和创新药物的开发有重要意义。柴归颗粒是本课题组经过前期对经典方剂逍遥散最佳抗抑郁组分进行药效学筛选和抗抑郁物质基础研究,并通过药效成分归属和临床观察对原方进行化裁而研发的抗抑郁中药新药,其处方由柴胡、当归、白芍、麸炒白术、炙甘草、薄荷 6 味中药组成。柴归颗粒已获得国家药物临床试验批件(2018L03149),多种抑郁动物模型均证明该药具有确切的抗抑郁作用^[4-7],目前正在开展药物临床试验研究^[8]。然而,柴归颗粒抗抑郁作用机制尚未明确。

外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)是由外周血中淋巴细胞和单核细胞等具有单个核的细胞组成(以淋巴细胞为主)。PBMCs 在免疫应答、代谢、与其他细胞和细胞外基质的通讯等方面发挥着重要作用^[9-11]。炎症及免疫反应在抑郁症的发病机制中起重要作用。

因此,与血清/血浆样本相比,以免疫细胞为主的 PBMCs 对于研究抑郁症的发生与免疫之间的联系更具有说服力。目前,已有大量的临床试验样本证据表明 PBMCs 的基因改变与抑郁症的关系非常密切。如崔雪莲^[12]以抑郁症和健康人的 PBMCs 为研究对象,用人类 LncRNA3.0 芯片初步筛查,结果发现 6 个 LncRNAs 有潜力作为抑郁症的诊断标志物,其中一个 LncRNA (NONHSAG045500)与 5-羟色胺转运体(serotonin transporter, SERT)的表达密切相关,可作为抗抑郁新型药物的靶点。Beech 等^[13]用微阵列技术检测 20 名抑郁症患者和 15 名健康人 PBMCs 的基因表达水平,结果发现其中 85 个差异表达基因显著富集途径为线粒体能量代谢途径,表明线粒体能量代谢途径在抑郁患者的病理生理过程中发挥重要作用。Pan 等^[14]采用转录组学技术研究产后抑郁症患者 PBMCs 基因表达情况,结果显示产后抑郁与参与能量代谢、神经退行性疾病和免疫应答的多种基因表达呈正相关。另有文献报道^[10],在抗抑郁治疗过程中抑郁患者 PBMCs 中的端粒酶活性增加与抑郁症状减少密切相关。阿戈美拉汀的长期给药降低抑郁模型大鼠 PBMCs 中色氨酸分解代谢途径上的 *Kmo* mRNA 表达,进一步调控蛋白表达起到抗抑郁作用^[15]。也有研究发现调节 Toll 受体 4 信号的 microRNA (let-7e、miR-146a 和 miR-155)在抑郁患者中表达降低,并且这些 microRNA 表达水平通过抗抑郁治疗后得到回调^[16]。抑郁症的严重程度与 PBMCs 中 2',5'-寡腺苷酸合成酶、Toll

受体及 P2X7 受体的含量呈正相关,与 β -抑制蛋白 1 的含量呈负相关^[17-20]。PBMCs 可通过血脑屏障进入中枢,参与脑内的病理生理过程^[21-22]。同时, PBMCs 表达抑郁症相关的基因与脑具有一定相似性^[23-24]。He 等^[25]对重度抑郁患者 PBMCs 的 miRNAs 表达水平进行研究,发现能够调控脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、环磷腺苷效应元件结合蛋白 1 (cAMP-response element binding protein, CREB) 表达的 miR-124 表达水平明显高于健康人,给予抗抑郁药后 miR-124 水平得到回调,提示大脑中丰富表达的 miR-124 可能作为抑郁症的外周系统的标志物。此外,鉴于脑脊液和脑组织活检样本在临床上不适用于常规筛查或诊断, PBMCs 在抑郁症诊断生物标志物筛选中显示出其独特的优势。综上所述,抑郁症发生必然对 PBMCs 造成影响,以 PBMCs 为切入点,适用于抑郁症发病机制及抗抑郁药物在基因或蛋白水平的深入研究。

转录组学是在整体水平上研究细胞中所有基因转录及转录调控规律的学科,有助于了解疾病发生发展过程中基因的表达情况,进而从转录水平揭示生命过程的代谢网络及调控机制^[26]。本研究借助转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 技术从基因水平进行研究,探寻正常、抑郁以及柴归颗粒干预后 PBMCs 中的差异表达基因,并对测序结果进行生物信息学分析及验证,以期阐明柴归颗粒改善抑郁症可能的靶基因及相关通路,进而阐明柴归颗粒抗抑郁的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,6~7 周龄,体质量 180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK (京) 2016-0006。实验期间动物保持自由饮水和进食,饲养环境温度为 (24±1) °C,湿度为 (55±5) %, 12 h 明暗交替光照,实验前适应性饲养 1 周。动物实验获得山西大学伦理委员会的批准 (批准号 SXULL-2020028)。

1.2 药材

柴归颗粒 (10 g/袋,批号 20181009) 由山西省中医研究院制剂中心制备,所用中药材有柴胡、当归、白芍、麸炒白术、炙甘草和薄荷,以上药材均购自山西省华阳药业有限公司,经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定分别为柴胡

Bupleurum chinense DC.、当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels.、白芍 *Paeonia lactiflora* Pall.、白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz.、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 和薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq., 均符合《中国药典》2020 年版标准。本课题组前期通过研究建立了柴归颗粒的指纹图谱并通过对照品指认出 12 种化学成分,分别为芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、阿魏酸、甘草酸铵、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b₂、白术内酯 III、欧前胡素、藁本内酯、白术内酯 I 和白术内酯 II。经高效液相色谱含量测定方法测得柴胡皂苷 a、b₂、b₁、d 的总质量分数为 0.68%,芍药苷的质量分数为 0.98% 以上,将柴胡皂苷 a、b₂、b₁、d 和芍药苷作为柴归颗粒的质控标准^[27-28]。

1.3 药品与试剂

盐酸文拉法辛缓释胶囊 (75 mg/粒,进口药品注册证号 H20160382H20160383,分包装批准文号国药准字 J20160087,批号 CF1090D) 购自 Pfizer Ireland Pharmaceuticals 公司;Oligo (dT) 18Primer (批号 AL11594A)、dNTP Mixture (批号 AJG1229A)、RNase Inhibitor (批号 AK32360A)、2×TaqPCR Master Mix (批号 U9202)、SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (批号 067600)、Trizol 试剂购自日本 Takara 公司;DEPC 处理水购自北京索莱宝生物科技有限公司;分析级氯仿、异丙醇和无水乙醇。

1.4 仪器

恒温鼓风干燥箱 (上海琅玕实验设备有限公司);大鼠旷场测试箱 (长 100 cm、宽 100 cm、高 70 cm,黑色,25 格,实验室自制);KQ-400KDE 型超声仪 (昆山市超声仪器有限公司);TDL-5 型高速离心机 (上海安亭科学仪器厂);BSA124S 型电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司);NC2000 Nanodrop 紫外定量仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Agilent Technologies 生物分析仪 2100 系统 (美国 CA 公司);DYY-6C 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司);BG-gdsAUTO (130) 凝胶成像系统 (北京百晶生物技术有限公司);2720 型 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司);FLX800T 型酶标仪 (美国 Bio Tek 公司)。

2 方法

2.1 柴归颗粒的制备

柴胡、当归、白芍、麸炒白术、炙甘草和薄荷 6 味药材用 8 倍量 85% 乙醇加热回流提取 2 次,每次 2 h,药液浓缩、干燥至浸膏;药渣用 8 倍量水提 2 次,每次 2 h,将水提液浓缩至 1.10 g/mL (65 °C),

乙醇沉淀浓度为 50%，静置 48 h，滤过，回收乙醇，浓缩、干燥至浸膏；混合乙醇提取物和水提醇沉物，即得复方柴归方提取物。淀粉、糊精、乳糖、预胶化淀粉均为辅料，采用干法制粒技术，取干浸膏粉，成品采用聚酯/镀铝聚酯/聚乙烯药用复合膜包装，即得到柴归颗粒。此工艺由山西省中医研究院制剂中心制备，10 g/袋，每袋含生药量 27.5 g。

2.2 分组与给药

经体质量、旷场实验、糖水偏爱实验测试后，选择指标相近的大鼠 60 只，随机分为对照组、模型组、盐酸文拉法辛（35 mg/kg）组和柴归颗粒低、中、高剂量（4.2、8.3、16.6 g/kg）组，每组 10 只，大鼠造模同时给药，各给药组 ig 相应药物（10 mL/kg），对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水，1 次/d，连续 28 d。

2.3 慢性不可预知温和应激（chronic unpredictable mild stress, CUMS）抑郁模型的建立

参照本课题组前期方法^[29]，建立 CUMS 大鼠抑郁模型。对照组大鼠正常饲养，不接受任何刺激。其余各组接受 28 d 造模程序，主要包括热刺激、4℃冰水游泳、超声刺激、夹尾、昼夜颠倒、足底电击、禁水（24 h）束缚和禁食（24 h）等。每组动物每天随机给予 1 种刺激，同一种刺激累计使用不超过 4 次。

2.4 行为学检测

参照本课题组前期行为学检测方法^[29]，进行行为学实验，包括体质量实验、糖水偏爱实验、旷场实验和强迫游泳实验。

2.4.1 体质量实验 在实验第 0、7、14、21 和 28 天分别称定大鼠体质量。

2.4.2 糖水偏爱实验 在实验之前，需要进行糖水偏爱训练。准备 1%蔗糖溶液和日常饮用水用于训练和实验。每只大鼠（单笼饲养）饲养笼上放置 2 个水瓶，训练开始第 1 天给予 2 瓶 1%蔗糖溶液，第 2 天将其中 1 瓶 1%蔗糖水溶液换为日常饮用水。训练结束后，所有大鼠禁食禁水 24 h，然后在 12 h 内正式进行糖水偏爱实验测定糖水消耗量，实验期间大鼠自由选择饮用 1%蔗糖水溶液或水。第 0 天测定糖水偏爱率的基线，第 28 天进行糖水偏爱实验，计算每只大鼠的糖水偏爱率。

糖水偏爱率 = 消耗的蔗糖水溶液的质量 / (消耗的蔗糖水溶液的质量 + 消耗日常饮用水的质量)

2.4.3 旷场实验 实验第 0、7、14、21、28 天，旷场实验装置的底部（100 cm × 100 cm × 40 cm）被等

分成 25 个正方形，在相对安静的环境里（≤60 分贝）从 16:00~19:00 时进行旷场实验测试。将大鼠置于旷场实验装置中 1 min 以适应环境，观察大鼠穿越格数（至少 3 只爪子跨过网格线）和直立次数（两前肢距离地面至少 1 cm）。适应环境 1 min 后，记录 4 min 内的大鼠的穿越格数和直立次数。

2.4.4 强迫游泳实验 强迫游泳实验装置为高 50 cm、直径 20 cm 的圆柱形有机玻璃容器，水温（25 ± 1）℃，水深 30 cm。实验第 28 天，每只大鼠接受 15 min 的强迫游泳训练，并在第 29 天进行强迫游泳实验。每只大鼠进行强迫游泳实验 6 min，在最后 4 min 记录不动时间。大鼠保持头部悬浮在水面上并且无明显挣扎的时间为不动时间。

2.5 PBMCs 样本收集

末次给药后，大鼠禁食不禁水 24 h，大鼠 ip 10% 水合氯醛（5 mL/kg）麻醉，腹主动脉取血，用肝素钠抗凝管收集血液约 10 mL。取血 1 h 内，取 15 mL 的离心管，先加入聚蔗糖-泛影葡胺分层液（Ficoll-Hypaque）5 mL，按照全血量与分离液比例为 1:1，再沿壁缓慢加入抗凝血，室温 2000 r/min 离心 25 min，吸取血浆至离心管，再取离心管吸取 PBMCs，加入适量清洗液，1000 r/min 离心 10 min，弃上清，清洗 2 次。根据行为学测试结果可以看出柴归颗粒中剂量组的抗抑郁效果较好，更接近对照组，因此选用对照组、模型组和柴归颗粒中剂量组大鼠 PBMCs 样本进行后续的 RNA-seq 实验。在对照组、模型组和柴归颗粒中剂量组中每组选取 4 个 PBMC 样本进行 RNA-seq 前样本准备，加入适量 PBS 溶液清洗细胞，1000 r/min 离心 5 min，弃上清，清洗 2 次；加入适量 Trizol 试剂提取总 RNA，反复吹打至 PBMCs 充分裂解，将裂解液转移至 1.5 mL 无酶管中液氮速冻，于 -80℃ 保存。

2.6 RNA-seq 分析

利用 RNA 6000Nanokit 检测仪检测所提 RNA 的浓度和纯度，质检合格后，通过 Oligo（dT）磁珠富集总 RNA 中带有 polyA 结构的 mRNA，采用离子打断的方式，将 RNA 打断到 200~300 bp 片段。随后合成 cDNA 第一链，并以第一链 cDNA 为模板合成第二链 cDNA，建立链特异性文库。使用安捷伦 2100 生物分析仪对文库进行质检，采用第二代测序技术，基于 Illumina HiSeq 测序平台，对文库进行双末端测序，得到 FASTQ 格式的原始数据（raw data）。使用 Cutadapt 软件对原始数据进行过滤，使

用 TopHat2 软件将过滤后得到的高质量序列 (cleaned data) 的 Reads 比对到参考基因组上。

2.7 RNA-seq 数据分析

使用 HTSeq 统计每组样本比对到每个基因上的 Reads 数, 作为基因的原始表达量, 然后采用 FPKM 对表达量进行标准化。采用 DESeq 对基因表达进行差异分析, 筛选差异表达基因条件: 表达差异倍数 > 1.2、 $P < 0.05$ 。采用 R 语言 ggplots2 软件包绘制差异表达基因的火山图, 使用 Venn 图统计差异基因个数以及各组差异分析之间的共有基因数量。为进一步筛选显著变化的基因群, 采用 STEM 软件将差异基因进行趋势分析。将差异基因注释到京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库中, 进而确定差异表达基因主要参与的代谢途径和信号通路。

2.8 qRT-PCR 验证

各组选取 6 只大鼠, 使用 Trizol 试剂提取 PBMCs

中的总 RNA。选取转录组数据中有趋势表达的差异基因进行 qRT-PCR 验证, *ACTB* 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算差异表达基因的 mRNA 相对表达量。胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 3 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3, *Enpp3*)、单磷酸腺苷脱氨酶 1 (adenosine monophosphate deaminase 1, *Ampd1*)、单磷酸鸟苷还原酶 2 (guanosine monophosphate reductase 2, *Gmpr2*)、胞质-5'-核苷酸酶 IIIA (5'-nucleotidase, cytosolic IIIA, *Nt5c3a*)、腺苷酸脱氨酶 (adenosine deaminase, *Ada*)、嘌呤核苷磷酸化酶 (purine nucleoside phosphorylase, *Pnp*)、黄嘌呤脱氢酶/氧化酶 (xanthine dehydrogenase/oxidase, *Xdh*)、鸟嘌呤脱氨酶 (guanine deaminase, *Gda*)、嘌呤能受体 P2X7 (purinergic receptor P2X7, *P2rx7*)、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , *IL1 β*) 引物采用 Primer 5 软件设计, 由上海生工生物工程股份有限公司合成, 各引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名	基因号 (ID)	序列 (5'-3')	产物大小/bp
<i>Enpp3</i>	ENSRNOG00000013791	F: CCATTGTCACGGGTTTGTAT R: CTCCACCAGGCAGGGTTA	121
<i>Ampd1</i>	ENSRNOG00000018656	F: CAAGCCCTACCCCTTACCCA R: CTTACGCTCCTTTAGCTCGTC	175
<i>Gmpr2</i>	ENSRNOG00000020216	F: ATGGCAGGCAATGTGGTAA R: CCGTCTGAAATGATGTGGC	297
<i>Nt5c3a</i>	ENSRNOG00000005981	F: AGGATGGCCGATGGTGTA R: CAACCTCCAGTGATTCTTCTTT	136
<i>Ada</i>	ENSRNOG00000010265	F: GGGACTACGCAACATTATCG R: CTTCTTTTGCCTTCATCTCC	149
<i>Pnp</i>	ENSRNOG00000009982	F: ACATCGACCTCAAGTGGA R: GGGAAAGTTGGGTATCTCATT	106
<i>Xdh</i>	ENSRNOG00000007081	F: TTTGCGAAGGATGAGGTAC R: GGATTGTGATAATGGCTGGA	133
<i>Gda</i>	ENSRNOG00000018282	F: CCCTCAGTATGCCTTTGCT R: TGGTGGTGCCGTTCTTTA	158
<i>P2rx7</i>	ENSRNOG00000001296	F: GTGCCATTCTGACCAGGGTTGTATAAA R: GCCACCTCTGTAAAGTTCTCTCCGATT	354
<i>IL1β</i>	ENSRNOG00000004649	F: TTGCTTCCAAGCCCTTGACT R: CTCCACGGGCAAGACATAGG	214
<i>ATCB</i>	ENSRNOG00000034254	F: GAGACCTTCAACACCCACAGC R: ATGTCACGCACGATTTCCTCC	205

2.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.01 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间使用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Dunnett- t 检验。

3 结果

3.1 行为学检测

3.1.1 体质量实验 如图 1-A 所示, 第 0 天, 各组大鼠体质量无差异, 体质量基线基本不变。如图 1-

B 所示, 第 28 天, 与对照组相比, 模型组大鼠体质量显著减轻 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 柴归颗粒中剂量组大鼠体质量明显增加 ($P < 0.05$), 表明柴归颗粒能够有效逆转 CUMS 造模引起的大鼠体质量减轻。

3.1.2 旷场实验 如图 2 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠穿越格数和直立次数显著减少 ($P < 0.001$), 表明 CUMS 模型成功复制。与模型组比较,

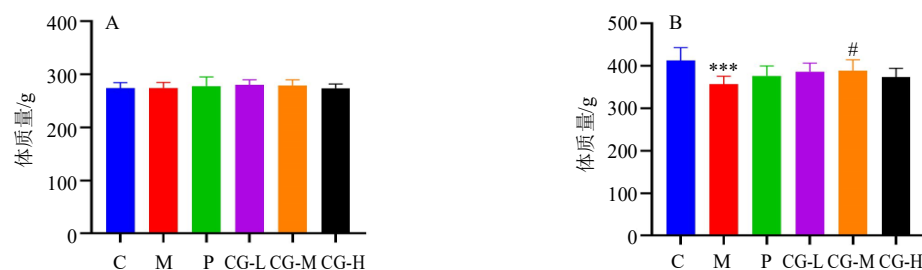


图 1 柴归颗粒对抑郁大鼠第 0 天 (A) 和第 28 天 (B) 体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effects of Chaigui Granules on body weight of depressed rats on day 0 (A) and day 28 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

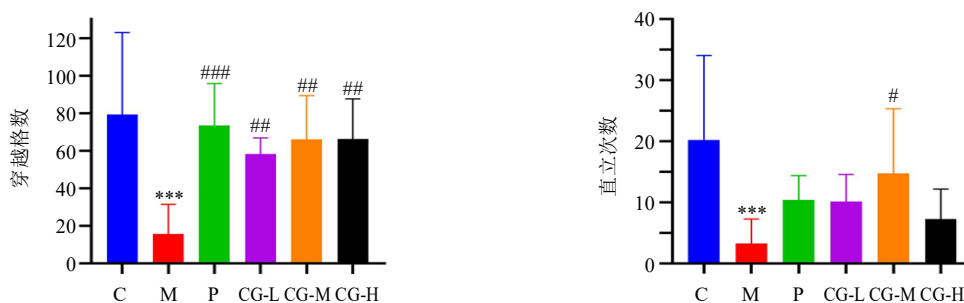


图 2 柴归颗粒对抑郁大鼠旷场实验中穿越格数和直立次数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of Chaigui Granules on number of crossing grids and uprights in open field test of depressed rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

各给药组大鼠穿越格数显著增加 ($P < 0.01, 0.001$), 柴归颗粒中剂量组大鼠直立次数显著增加 ($P < 0.05$)。表明柴归颗粒能够有效改善 CUMS 抑郁大鼠的旷场活动情况, 且柴归颗粒中剂量组效果最佳。

3.1.3 糖水偏爱和强迫游泳实验 如图 3 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠糖水偏爱率显著降低 ($P < 0.001$), 强迫游泳不动时间显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠糖水偏爱率显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 柴归颗粒各剂量组大鼠强

迫游泳不动时间显著减少 ($P < 0.05, 0.01$)。表明柴归颗粒能够显著逆转抑郁大鼠的快感缺失和行为绝望现象, 具有显著的抗抑郁的作用。

3.2 RNA-seq 分析

3.2.1 测序数据质量评估 所建立的测序文库中, 12 个样品的原始数据为 $4.4 \times 10^7 \sim 5.5 \times 10^7$, 每个 cDNA 文库平均获得 4.9×10^7 个原始数据, 其中 12 个样品的 Reads 差异较小, 质量值 ≥ 20 的碱基所占百分比 (Q_{20}) $\geq 98.09\%$, 质量值 ≥ 30 的碱基所占

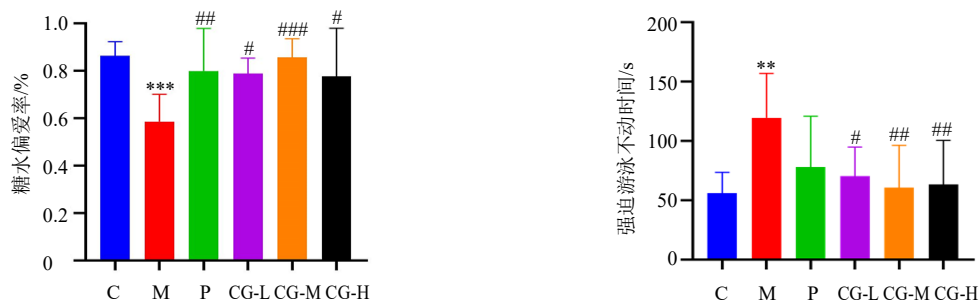


图 3 柴归颗粒对抑郁大鼠糖水偏爱率和强迫游泳不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of Chaigui Granules on sucrose preference rate and forced swimming immobility time of depressed rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

百分比 (Q_{30}) $\geq 95.06\%$, 表明测序结果较好, 可用于后续的分析 (表 2)。

3.2.2 差异表达基因分析 采用 DESeq 对基因表达进行差异分析, 如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组共有 256 个显著差异表达基因, 其中显著上调的差异基因为 105 个, 显著下调的差异基因为 151 个; 与模型组相比, 柴归颗粒中剂量组共有 2702 个显著差异表达基因, 其中显著上调的差异基因为 1343 个, 显著下调的差异基因为 1359 个。

3.2.3 差异表达基因的 KEGG 通路分析 将筛选出的差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析, 如图 5 所示, 与对照组相比, 模型组差异表达基因显著富集到的信号通路主要有 B 细胞受体信号通路、Toll 样受体信号通路、Janus 激酶-信号转导与转录活化因子 (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT) 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 信号通路

等, 研究报道这些信号通路与抑郁症的发病机制密切相关^[30-32]。差异表达基因显著富集到的代谢通路主要有糖胺聚糖生物合成和嘌呤代谢等。

如图 6 所示, 与模型组相比, 柴归颗粒中剂量组差异表达基因显著富集到的信号通路主要有 Toll 样受体信号通路、HIF-1 信号通路、环磷酸鸟苷-蛋白激酶 G (cyclic guanosine monophosphate-protein kinase G, cGMP-PKG) 信号通路、Notch 信号通路、C 型凝集素受体信号通路和 p53 信号通路等。差异表达基因显著富集到的代谢通路主要有氧化磷酸化、丙酮酸代谢和嘌呤代谢等。

由上述结果可知抑郁发生时及柴归颗粒干预后都显著富集到嘌呤代谢通路。同时, 基于目前调控嘌呤代谢抗抑郁的作用机制研究主要集中在嘌呤分解代谢, 因此对测序结果进一步挖掘, 对嘌呤分解代谢和嘌呤能系统相关的差异表达基因进行统计分析, 结果见表 3。柴归颗粒干预后, 在核苷酸水平

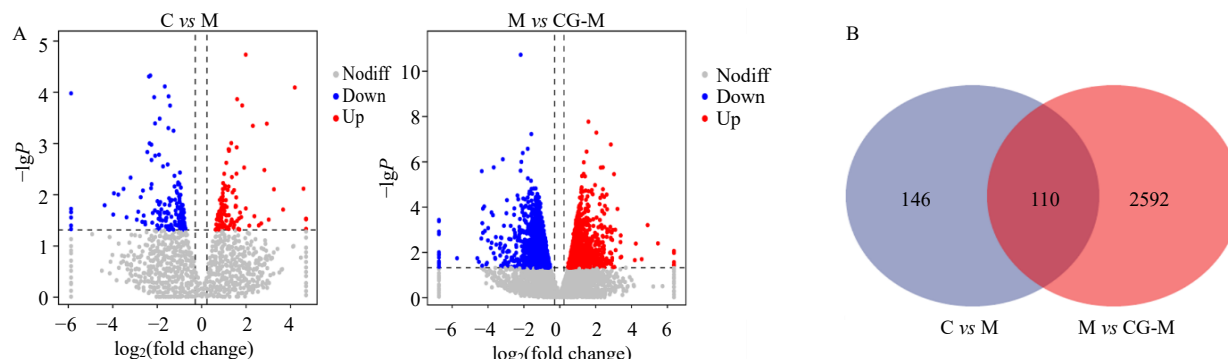
表 2 每个样本 cDNA 文库的测序数据

Table 2 Sequencing data of cDNA library in each sample

样本	原始条目	原始数据	Q_{30} 数据	过滤条目	测序错误率/%	$Q_{20}/\%$	$Q_{30}/\%$
C1	55 056 736	8 258 510 400	7 851 013 242	7 648 513 800	0.001 327	98.09	95.06
C2	51 320 648	7 698 097 200	7 359 697 513	7 093 751 700	0.001 273	98.35	95.60
C3	54 235 118	8 135 267 700	7 768 675 031	7 518 813 000	0.001 352	98.25	95.49
C4	44 196 614	6 629 492 100	6 331 351 490	6 208 298 100	0.000 206	98.23	95.50
M1	51 243 990	7 686 598 500	7 353 804 378	7 081 146 900	0.000 221	98.31	95.67
M2	44 989 926	6 748 488 900	6 431 558 827	6 264 447 000	0.000 220	98.14	95.30
M3	55 924 198	8 388 629 700	7 862 156 444	9 702 595 200	0.001 275	98.16	95.74
M4	53 359 258	8 003 888 700	7 615 014 586	7 434 598 200	0.000 223	98.10	95.14
CG-M1	44 703 714	6 705 557 100	6 423 214 375	6 194 225 700	0.001 275	98.40	95.78
CG-M2	53 714 596	8 057 189 400	7 747 965 767	7 427 522 700	0.001 272	98.52	96.16
CG-M3	44 819 528	6 722 929 200	6 426 146 322	6 217 330 200	0.000 222	98.30	95.58
CG-M4	53 934 166	8 090 124 900	7 702 809 774	7 504 610 700	0.001 280	98.16	95.21

C-对照组 M-模型组 P-盐酸文拉法辛组 CG-M-柴归颗粒中剂量组

C-control group M-model group P-venlafaxine hydrochloride group CG-M-Chaigui Granules medium-dose group



红色: 上调基因; 蓝色: 下调基因; 灰色: 无显著性差异基因

Red: up-regulated genes; blue: down-regulated genes; gray: insignificant differential genes

图 4 差异表达基因的火山图 (A) 和 Venn 图 (B)

Fig. 4 Volcanic map (A) and Venn diagram (B) of differentially expressed genes

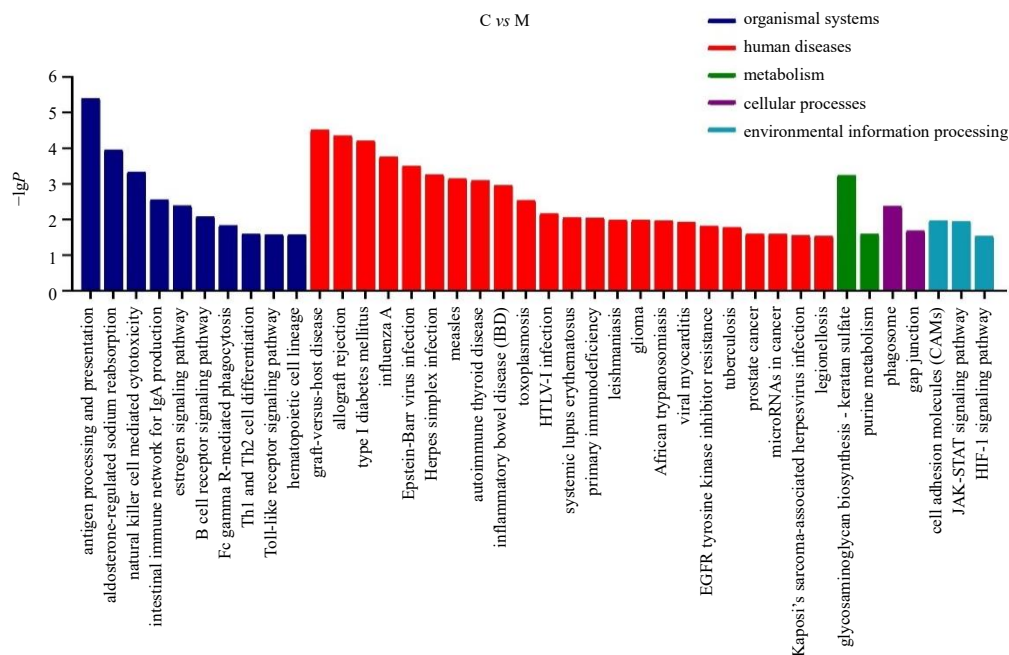


图5 CUMS 造模后差异基因的 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of differential genes after CUMS modeling

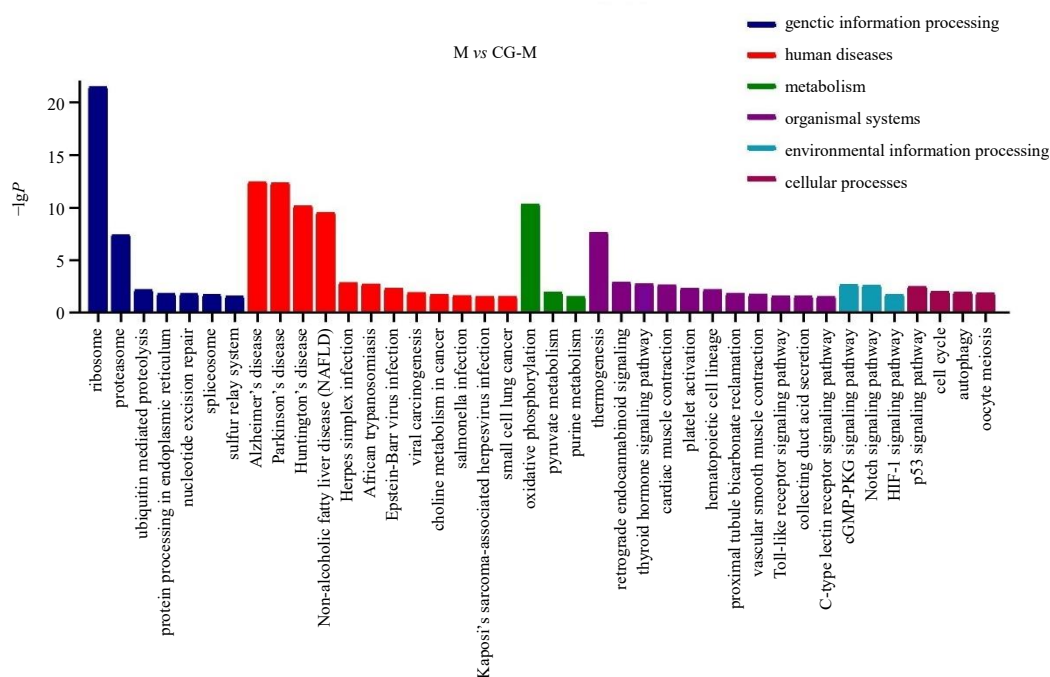


图6 柴归颗粒干预后差异基因的 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis of differential genes after Chaigui Granules intervention

上的 *Ampd1* 和 *Gmpr2* 基因表达水平显著降低；在核苷水平上的 *Nt5c3a* 和 *Ada* 基因表达水平显著升高；在碱基水平上的 *Gda* 基因表达水平显著升高，*Pnp* 和 *Xdh* 基因表达水平有升高趋势；嘌呤能系统中的 *IL1β* 基因表达水平显著降低，*P2rx7* 基因表达水平有降低趋势。

3.3 嘌呤代谢分解途径关键基因的 qRT-PCR 验证

以 *ATCB* 为内参，采用 qRT-PCR 法对 RNA-seq 结果中嘌呤分解代谢途径上的 8 个关键基因 *Enpp3*、*Ampd1*、*Gmpr2*、*Nt5c3a*、*Pnp*、*Ada*、*Xdh*、*Gda* 以及嘌呤能通路上 2 个基因 *P2rx7*、*IL1β* 进行 mRNA 表达水平的验证。结果如图 7 所示，与对照组相比，

表 3 柴归颗粒干预抑郁大鼠嘌呤代谢途径关键基因的表达

Table 3 Chaigui Granules interfere with key genes expression in purine metabolism pathway in depressed rats

基因号 (ID)	基因	P 值	倍数变化 (vs 模型)	趋势 (vs 模型)
ENSRNOG00000018656	<i>Ampd1</i>	0.013 567 527	0	↓
ENSRNOG00000013791	<i>Enpp3</i>	0.227 797 850	1.556 860 409	↑
ENSRNOG00000005981	<i>Nt5c3a</i>	3.63×10^{-6}	2.559 357 634	↑
ENSRNOG00000009982	<i>Pnp</i>	0.228 367 982	1.277 001 431	↑
ENSRNOG00000018282	<i>Gda</i>	0.044 530 018	2.159 190 490	↑
ENSRNOG00000007081	<i>Xdh</i>	0.143 547 798	1.326 008 513	↑
ENSRNOG00000010265	<i>Ada</i>	0.054 164 423	1.468 402 782	↑
ENSRNOG00000020216	<i>Gmpr2</i>	0.000 785 094	0.484 805 139	↓
ENSRNOG00000001296	<i>P2rx7</i>	0.393 944 765	0.322 012 382	↓
ENSRNOG00000004649	<i>IL1β</i>	0.009 203 817	0.329 862 979	↓

↑: 上调; ↓: 下调

↑: up-regulated; ↓: down-regulated

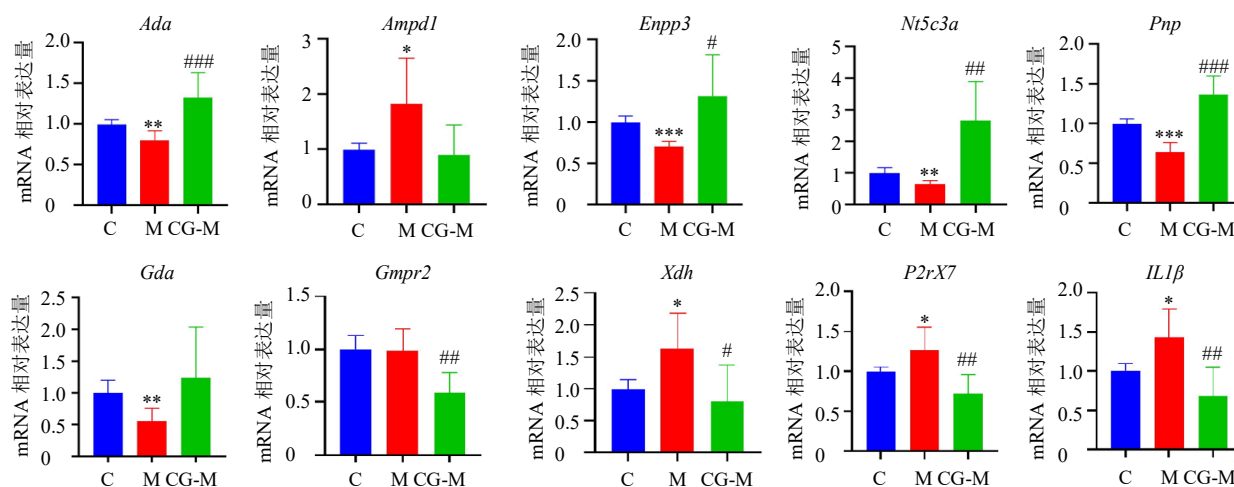


图 7 qRT-PCR 检测 *Ada*、*Ampd1*、*Enpp3*、*Nt5c3a*、*Pnp*、*Gda*、*Gmpr2*、*Xdh*、*P2rx7* 和 *IL1 β* mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 7 mRNA expressions of *Ada*, *Ampd1*, *Enpp3*, *Nt5c3a*, *Pnp*, *Gda*, *Gmpr2*, *Xdh*, *P2rx7* and *IL1 β* detected by qRT-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

模型组 *Enpp3*、*Nt5c3a*、*Pnp*、*Ada*、*Gda* mRNA 表达水平显著下调 ($P < 0.01$ 、 0.001)；*Ampd1*、*Xdh*、*P2X7*、*IL1 β* mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.05$)。与模型组相比，柴归颗粒中剂量组 *Enpp3*、*Nt5c3a*、*Pnp*、*Ada* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，*Gmpr2*、*Xdh*、*P2rx7*、*IL1 β* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

CUMS 是目前较为公认的抑郁症动物模型，联合孤养的动物模型^[33]能够稳定地模拟人类抑郁症患者的核心症状，即快感缺失，且具有高度的有效性，基于此模型研究抑郁症的病因学和抗抑郁药的作用有重要的科学意义。本研究采用 CUMS 联合孤养的抑郁模型，通过各种行为学指标（体质量、旷场实验、糖水实验和强迫游泳实验）对柴归颗粒进行药效学评价，同时通过转录组学技术对大鼠

PBMCs 样本进行转录水平分析，采用 RNA-seq 高通量测序技术对对照组、模型组和柴归颗粒中剂量组的 PBMCs 样本进行分析，结果表明，与对照组相比，模型组共筛选出 256 个差异表达基因；与模型组相比，柴归颗粒中剂量组共筛选出 2702 个差异表达基因。KEGG 通路富集显示抑郁发生时及柴归干预后都显著富集到嘌呤代谢。然后利用 qRT-PCR 验证嘌呤代谢过程中的 8 个关键基因 *Enpp3*、*Ampd1*、*Gmpr2*、*Nt5c3a*、*Pnp*、*Ada*、*Xdh*、*Gda* 以及嘌呤能通路上的 2 个基因 *P2X7*、*IL1 β* 的表达，验证结果与 RNA-seq 结果基本一致。以上结果表明柴归颗粒具有抗抑郁作用，其作用机制与调节嘌呤代谢途径上的基因及嘌呤能受体 *P2X7* 和炎症因子 *IL1 β* 有关，该结果为后续柴归颗粒抗抑郁作用机制的深入阐明提供了基础。

多条证据显示，抑郁发生时嘌呤代谢途径中的

代谢物发生明显变化^[34-37]。多种酶参与嘌呤代谢过程且在该过程中发挥着重要作用。其中, Nt5c3a 和 Pnp 是嘌呤代谢核苷酸分解代谢过程重要的酶。Pnp 和 5'-核苷酸酶在正常 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的分化中起着重要作用^[38]。Pnp 的缺乏会使 T 细胞和 B 细胞免疫力受到影响, 还会导致三磷酸鸟苷 (guanosine triphosphate, GTP) 升高从而抑制核糖核苷酸还原酶, 阻碍细胞分裂^[39]。研究表明细胞内 Nt5c3a 是干扰素和细胞因子信号传导中的负表观遗传因子^[40]。本研究发现 CUMS 抑郁大鼠 PBMCs 中 Nt5c3a 和 Pnp 的表达降低, 柴归颗粒干预后这 2 种基因的表达显著回调, 提示其可能产生细胞因子信号的传导并影响免疫细胞分裂和分化, 与抑郁症的发生关系密切。

Ada 是嘌呤代谢中的一种关键酶, 它通过将腺苷不可逆转的脱氨为肌苷来调节细胞外和细胞内腺苷的浓度^[41-42]。Ada 通过催化腺苷和脱氧腺苷的脱氨基作用影响甲基化过程、细胞生长和分化、细胞凋亡、DNA 复制和免疫功能^[43]。文献报道 Ada 的主要功能是发展和维持免疫系统, 在免疫细胞功能紊乱的疾病中, Ada 的活性发生了变化^[44]。淋巴细胞的增殖和分化也需要 Ada^[45-46]。Elgün 等^[47]发现在重度抑郁症患者血清中 Ada 水平下降, Ada 水平与抑郁症症状存在负相关。也有研究表明 Ada 的活性降低导致腺苷浓度增加对于诱发抑郁症是一个危险信号, 外源性 Ada 加速腺苷的降解, 能缩短小鼠自发电皮质活动的抑郁症持续时间^[48]。本研究发现 CUMS 抑郁大鼠 PBMCs 中 Ada 的表达显著降低, 与上述文献报道一致, 提示与对照组相比, CUMS 抑郁大鼠的免疫系统出现紊乱, 给予柴归颗粒后 Ada 的表达水平显著升高。提示柴归颗粒可能通过回调 Ada 的表达, 从而介导细胞免疫功能恢复正常发挥抗抑郁作用。

Xdh 位于所有有核细胞中, 催化次黄嘌呤和黄嘌呤转化为尿酸, 这是嘌呤核苷酸分解代谢的另一种关键酶。本研究发现 CUMS 抑郁大鼠 PBMCs 中 Xdh 的表达显著升高。Herken 等^[49]发现抑郁症患者血清中 Xdh 水平显著升高。在反复抑郁发作患者死后的脑组织中, 在皮质边缘丘脑纹状体区域检测到 Xdh 活性增加^[50]。Xdh 催化次黄嘌呤和黄嘌呤氧化过程会产生活性氧和过氧化氢等^[51], 从而导致以氧化应激和炎症为特征的病理反应^[52-53]。一项在人类和小鼠巨噬细胞中进行的研究表明, Xdh 引起的活

性氧生成是促进 Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3) 活化的主要来源^[54]。抑郁症的发病机制与氧化应激相关酶活性的变化和炎症反应密切相关。Gürbüz 等^[55]使用 Xdh 抑制剂阿洛普利诺与经典抗抑郁药氟西汀作比较, 发现使用 Xdh 抑制剂阿洛普利诺后抑郁大鼠的强迫游泳不动时间明显减少, 与氟西汀的抗抑郁效果一致。本研究结果显示, 给予柴归颗粒后, Xdh 的表达水平显著降低, 柴归颗粒有改善抑郁症的作用。综上推断, 抑郁发生时 Xdh 水平升高引起活性氧的生成, 可能进一步促进 NLRP3 活化, 调控下游信号通路, 从而导致氧化应激和炎症为特征的病理状态。而柴归颗粒是否通过这一作用机制发挥抗抑郁需要进一步研究验证。

此外, 目前已经发现嘌呤能系统在抑郁症发病机制中占有重要地位, 通过调控嘌呤能系统可有效改善抑郁症^[56-59]。嘌呤能受体 (腺苷 P1 受体中 A1、A2A 亚型与 ATP 结合的 P2 受体中 P2X7 亚型) 与抑郁症诱发神经炎症紧密相关^[60-62]。研究显示 P2rX7 主要位于兴奋性细胞膜、神经元和平滑肌中, 也存在于粒细胞、淋巴细胞、肥大细胞和单核细胞中^[63]。随着抑郁发病机制的不断研究, 已证明抑郁症机体中嘌呤能 P2X7 受体是一种成熟的炎症小体激活剂, 不仅可以激活 NLRP3 炎症小体, 还会促进炎症因子的释放, P2X7 受体已被公认为炎症反应的调节因子^[64-66]。本研究发现抑郁大鼠 PBMCs 中 P2rX7 和 IL1 β 的表达水平显著升高, 给予柴归颗粒后, 它们的表达水平显著降低。提示抑郁症的发生与炎症反应密切相关, 柴归颗粒能够调控 P2rX7, 减少炎症因子的释放, 从而发挥抗抑郁作用。但还需要进一步验证该通路蛋白的表达情况, 明确柴归颗粒抗抑郁的作用机制。

综上所述, 柴归颗粒对抑郁大鼠有明显的改善作用, 其作用机制与调节嘌呤代谢途径上的基因及嘌呤能受体 P2X7 和炎症因子 IL1 β 有关, 为后续柴归颗粒抗抑郁作用机制的深入研究提供了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] GBD Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease

- Study 2017 [J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 1789-1858.
- [2] 于冰清, 邵欣欣, 付晓凡, 等. 抗抑郁中药复方的组方特点及作用机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3344-3352.
- [3] 马小雅, 丁敏芮, 施侠威, 等. 中药复方辨证治疗抑郁症的现代数据研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(7): 1418-1423.
- [4] 刘欢. 复方柴归方抗抑郁药效研究 [D]. 太原: 山西大学, 2016.
- [5] 张潇. 柴归方提取物抗抑郁药效特点研究 [D]. 太原: 山西大学, 2017.
- [6] 许腾, 张潇, 高耀, 等. 柴归颗粒对抑郁症伴发症状的改善作用研究 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3846-3851.
- [7] 赵映霞, 许腾, 田俊生, 等. 柴归颗粒对慢性不可预知温和刺激抑郁大鼠模型肠道菌群的作用 [J]. 中草药, 2021, 52(3): 736-743.
- [8] 秦雪梅, 高耀, 田俊生, 等. 从柴胡药材质量评价到抗抑郁新药开发的研究思路与策略 [J]. 药学报, 2019, 54(8): 1402-1408.
- [9] Grosse L, Carvalho L A, Birkenhager T K, *et al.* Circulating cytotoxic T cells and natural killer cells as potential predictors for antidepressant response in melancholic depression. Restoration of T regulatory cell populations after antidepressant therapy [J]. *Psychopharmacology* (Berl), 2016, 233(9): 1679-1688.
- [10] Wolkowitz O M, Mellon S H, Epel E S, *et al.* Resting leukocyte telomerase activity is elevated in major depression and predicts treatment response [J]. *Mol Psychiatry*, 2012, 17(2): 164-172.
- [11] Stapel B, Gorinski N, Gmahl N, *et al.* Fluoxetine induces glucose uptake and modifies glucose transporter palmitoylation in human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(10): 883-891.
- [12] 崔雪莲. 抑郁症外周血单核细胞中差异性表达 lncRNA 的临床和实验研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2018.
- [13] Beech R D, Lowthert L, Leffert J J, *et al.* Increased peripheral blood expression of electron transport chain genes in bipolar depression [J]. *Bipolar Disord*, 2010, 12(8): 813-824.
- [14] Pan D Q, Xu Y M, Zhang L, *et al.* Gene expression profile in peripheral blood mononuclear cells of postpartum depression patients [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 10139.
- [15] Wigner P, Synowiec E, Jóźwiak P, *et al.* The impact of chronic mild stress and agomelatine treatment on the expression level and methylation status of genes involved in tryptophan catabolic pathway in PBMCs and brain structures [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(9): E1093.
- [16] Hung Y Y, Wu M K, Tsai M C, *et al.* Aberrant expression of intracellular let-7e, miR-146a, and miR-155 correlates with severity of depression in patients with major depressive disorder and is ameliorated after antidepressant treatment [J]. *Cells*, 2019, 8(7): E647.
- [17] Hung Y Y. Antidepressants improve negative regulation of toll-like receptor signaling in monocytes from patients with major depression [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2018, 25(1): 42-48.
- [18] Xie B, Chen Y, Zhang S, *et al.* The expression of P2X7 receptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with primary Sjögren's syndrome and its correlation with anxiety and depression [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2014, 32(3): 354-360.
- [19] Felger J C, Cole S W, Pace T W, *et al.* Molecular signatures of peripheral blood mononuclear cells during chronic interferon- α treatment: Relationship with depression and fatigue [J]. *Psychol Med*, 2012, 42(8): 1591-1603.
- [20] Alam F, Nayyar S, Richie W, *et al.* Beta-Arrestin1 levels in mononuclear leukocytes support depression scores for women with premenstrual dysphoric disorder [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2015, 13(1): ijerph13010043.
- [21] Spampinato S F, Merlo S, Fagone E, *et al.* Astrocytes modify migration of PBMCs induced by β -amyloid in a blood-brain barrier *in vitro* model [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 337.
- [22] Labus J, Wöltje K, Stolte K N, *et al.* IL-1 β promotes transendothelial migration of PBMCs by upregulation of the FN/ $\alpha_5\beta_1$ signalling pathway in immortalised human brain microvascular endothelial cells [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 373(1/2): 99-111.
- [23] Woelk C H, Singhanian A, Pérez-Santiago J, *et al.* The utility of gene expression in blood cells for diagnosing neuropsychiatric disorders [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2011, 101: 41-63.
- [24] Liang Y, Ridzon D, Wong L, *et al.* Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues [J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 166.
- [25] He S, Liu X H, Jiang K D, *et al.* Alterations of microRNA-124 expression in peripheral blood mononuclear cells in pre- and post-treatment patients with major depressive disorder [J]. *J Psychiatr Res*, 2016, 78: 65-71.
- [26] Li J, Tang G, Cheng K, *et al.* Peripheral blood mononuclear cell-based metabolomic profiling of a chronic unpredictable mild stress rat model of depression [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(11): 2994-3001.
- [27] 赵玉娇. 柴归颗粒制剂成型工艺与质量标准研究 [D]. 太原: 山西大学, 2018.
- [28] 宫文龙. 柴归颗粒中柴胡皂苷含量测定方法修订及影

- 响成分含量与转化的因素研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [29] Gong W X, Zhu S W, Chen C C, *et al.* The anti-depression effect of *Angelicae Sinensis Radix* is related to the pharmacological activity of modulating the hematological anomalies [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 192.
- [30] Figueroa-Hall L K, Paulus M P, Savitz J. Toll-like receptor signaling in depression [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, 121: 104843.
- [31] Fabbri C, Marsano A, Albani D, *et al.* PPP3CC gene: A putative modulator of antidepressant response through the B-cell receptor signaling pathway [J]. *Pharmacogenomics J*, 2014, 14(5): 463-472.
- [32] Shariq A S, Brietzke E, Rosenblatt J D, *et al.* Therapeutic potential of JAK/STAT pathway modulation in mood disorders [J]. *Rev Neurosci*, 2018, 30(1): 1-7.
- [33] Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1997, 134(4): 319-329.
- [34] Agren H, Niklasson F, Hällgren R. Brain purinergic activity linked with depressive symptomatology: Hypoxanthine and xanthine in CSF of patients with major depressive disorders [J]. *Psychiatry Res*, 1983, 9(3): 179-189.
- [35] Niklasson F, Agren H, Hällgren R. Purine and monoamine metabolites in cerebrospinal fluid: Parallel purinergic and monoaminergic activation in depressive illness? [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1983, 46(3): 255-260.
- [36] Ali-Sisto T, Tolmunen T, Toffol E, *et al.* Purine metabolism is dysregulated in patients with major depressive disorder [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2016, 70: 25-32.
- [37] Zhou X Y, Liu L X, Lan X H, *et al.* Polyunsaturated fatty acids metabolism, purine metabolism and inosine as potential independent diagnostic biomarkers for major depressive disorder in children and adolescents [J]. *Mol Psychiatry*, 2019, 24(10): 1478-1488.
- [38] Giblett E R, Ammann A J, Wara D W, *et al.* Nucleoside-phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity [J]. *Lancet*, 1975, 1(7914): 1010-1013.
- [39] Markert M L. Purine nucleoside phosphorylase deficiency [J]. *Immunodeficiency Rev*, 1991, 3(1): 45-81.
- [40] Al-Haj L, Khabar K S A. The intracellular pyrimidine 5'-nucleotidase NT5C3A is a negative epigenetic factor in interferon and cytokine signaling [J]. *Sci Signal*, 2018, 11(518): eaal2434.
- [41] Franco R, Pacheco R, Gatell J M, *et al.* Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function [J]. *Crit Rev Immunol*, 2007, 27(6): 495-509.
- [42] Takhshid M A, Zahediannejad Z, Aboulizadeh F, *et al.* G22A polymorphism of adenosine deaminase and its association with biochemical characteristics of gestational diabetes mellitus in an Iranian population [J]. *Iran J Med Sci*, 2015, 40(2): 170-174.
- [43] Dong R P, Kameoka J, Hegen M, *et al.* Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response [J]. *J Immunol*, 1996, 156(4): 1349-1355.
- [44] Jadhav A A, Jain A. Adenosine deaminase activity in normal pregnancy and pregnancy associated disorders [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2013, 119(2): 88-91.
- [45] Mishra O P, Gupta B L, Ali Z, *et al.* Adenosine deaminase activity in typhoid fever [J]. *Indian Pediatr*, 1994, 31(11): 1379-1384.
- [46] Santosh U P, Renukananda G S, Abhilash S. Role of adenosine deaminase in common chronic ENT infections [J]. *J Clin Diagn Res*, 2016, 10(3): MC01-MC02.
- [47] Elgün S, Keskinoglu A, Kumbasar H. Dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase activity. Decrease in depression [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 1999, 24(8): 823-832.
- [48] Lindquist B E, Shuttleworth C W. Evidence that adenosine contributes to Leao's spreading depression *in vivo* [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(5): 1656-1669.
- [49] Herken H, Gurel A, Selek S, *et al.* Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: Impact of antidepressant treatment [J]. *Arch Med Res*, 2007, 38(2): 247-252.
- [50] Michel T M, Camara S, Tatschner T, *et al.* Increased xanthine oxidase in the thalamus and putamen in depression [J]. *World J Biol Psychiatry*, 2010, 11(2 Pt 2): 314-320.
- [51] Harrison R. Physiological roles of xanthine oxidoreductase [J]. *Drug Metab Rev*, 2004, 36(2): 363-375.
- [52] Nakai K, Kadiiska M B, Jiang J J, *et al.* Free radical production requires both inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase in LPS-treated skin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(12): 4616-4621.
- [53] Hassoun P M, Yu F S, Cote C G, *et al.* Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and hypoxia. Role in acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158(1): 299-305.
- [54] Ives A, Nomura J, Martinon F, *et al.* Xanthine oxidoreductase regulates macrophage IL1 β secretion upon

- NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6555.
- [55] Gürbüz Özgür B, Aksu H, Birincioğlu M, *et al*. Antidepressant-like effects of the xanthine oxidase enzyme inhibitor allopurinol in rats. A comparison with fluoxetine [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, 138: 91-95.
- [56] Ribeiro D E, Roncalho A L, Glaser T, *et al*. P2X7 receptor signaling in stress and depression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): E2778.
- [57] Wang P, Jia J D, Zhang D. Purinergic signalling in liver diseases: Pathological functions and therapeutic opportunities [J]. *JHEP Rep*, 2020, 2(6): 100165.
- [58] Ballesteros-Yáñez I, Castillo C A, Merighi S, *et al*. The role of adenosine receptors in psychostimulant addiction [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 985.
- [59] 陈佳俊, 秦雪梅, 杜冠华, 等. 基于嘌呤能系统及嘌呤代谢的抑郁症发病机制研究进展 [J]. *药学学报*, 2021, 56(9): 2464-2471.
- [60] Leem Y H, Jang J H, Park J S, *et al*. Exercise exerts an anxiolytic effect against repeated restraint stress through 5-HT_{2A}-mediated suppression of the adenosine A_{2A} receptor in the basolateral amygdala [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2019, 108: 182-189.
- [61] Rombo D M, Dias R B, Duarte S T, *et al*. Adenosine A1 receptor suppresses tonic GABAA receptor currents in hippocampal pyramidal cells and in a defined subpopulation of interneurons [J]. *Cereb Cortex*, 2016, 26(3): 1081-1095.
- [62] Manzoni O J, Manabe T, Nicoll R A. Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus [J]. *Science*, 1994, 265(5181): 2098-2101.
- [63] Abbracchio M P, Burnstock G, Verkhratsky A, *et al*. Purinergic signalling in the nervous system: An overview [J]. *Trends Neurosci*, 2009, 32(1): 19-29.
- [64] di Virgilio F, Schmalzing G, Markwardt F. The elusive P2X7 macropore [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(5): 392-404.
- [65] Su W J, Zhang T, Jiang C L, *et al*. Clemastine alleviates depressive-like behavior through reversing the imbalance of microglia-related pro-inflammatory state in mouse hippocampus [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 412.
- [66] Li K W, Yan L, Zhang Y P, *et al*. Seahorse treatment improves depression-like behavior in mice exposed to CUMS through reducing inflammation/oxidants and restoring neurotransmitter and neurotrophin function [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112487.

[责任编辑 李亚楠]