

基于 NLRP3/细胞焦亡通路研究荆芥挥发油的抗抑郁作用及作用机制

秦甜甜^{1,2}, 黄如杨^{1,2}, 谢红潇^{1,2}, 胡靖文^{1,2}, 曾九僧^{1,2}, 刘 蓉^{1,2*}, 曾 南^{1,2*}

1. 成都中医药大学 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 观察荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* 挥发油对慢性温和不可预知应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 模型小鼠抑郁样行为的干预作用, 探究其调控 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3) 炎症小体/细胞焦亡从而抑制神经炎症的作用机制。方法 雄性 ICR 小鼠制备 CUMS 抑郁样模型, 依据糖水偏好率将造模成功的小鼠随机分为模型组、氟西汀 (10 mg/kg) 组和荆芥挥发油高、低剂量 (100、50 mg/kg) 组, 同时设置对照组。给予药物干预 5 周后, 进行小鼠糖水偏好实验、强迫游泳实验、悬尾实验与飞溅实验。行为学测试结束后, 取血并分离血清, 取海马组织。ELISA 法测定血清中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平; 尼氏染色法检测海马 CA3 区神经元尼氏小体平均吸光度值; 免疫荧光法检测海马 CA3 区 NLRP3、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cleaved cysteine-aspartate protease-1, cleaved Caspase-1)、IL-1 β 及小胶质细胞离子钙结合适配器分子-1 (ionized calcium binding adapter molecule-1, Iba-1) 表达; Western blotting 检测海马组织 NLRP3 炎症小体及焦亡通路相关蛋白表达。结果 与模型组比较, 荆芥挥发油能明显提高小鼠糖水偏好率 ($P < 0.01$), 显著缩短小鼠强迫游泳与悬尾实验中的不动时间 ($P < 0.01$ 、 0.001), 明显延长飞溅实验中的小鼠梳理时间 ($P < 0.05$), 表现出抗抑郁样行为作用。荆芥挥发油显著降低小鼠血清中 IL-1 β 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 增加海马 CA3 区神经元尼氏小体数目 ($P < 0.05$ 、 0.01), 减弱海马 CA3 区 cleaved Caspase-1、IL-1 β 及 Iba-1 的平均荧光强度 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 并显著下调海马组织 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、Caspase-1、cleaved Caspase-1、IL-1 β 、pro IL-1 β 、gasdermin-D (GSDMD)、N-GSDMD 及 Iba-1 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 荆芥挥发油能改善 CUMS 模型小鼠的抑郁样行为, 具有抗抑郁作用, 其作用机制与抑制 NLRP3 炎症小体激活及细胞焦亡、抑制小胶质细胞活化, 从而减轻神经炎症反应与神经元损伤有关。

关键词: 荆芥挥发油; 抑郁; 慢性温和不可预知应激; 神经炎症; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3; 细胞焦亡; 胡薄荷酮; 异薄荷酮; 薄荷酮; 胡椒酮

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)12-3878-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.014

Antidepressant effect and mechanism of essential oil from *Schizonepeta tenuifolia* based on NLRP3/pyroptosis pathway

QIN Tian-tian^{1,2}, HUANG Ru-yang^{1,2}, XIE Hong-xiao^{1,2}, HU Jing-wen^{1,2}, ZENG Jiu-seng^{1,2}, LIU Rong^{1,2}, ZENG Nan^{1,2}

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To observe the intervention effect of essential oil from *Schizonepeta tenuifolia* on depression-like behavior in chronic unpredictable mild stress (CUMS) model mice, and investigate its mechanism of regulating NOD-like receptor pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome and pyroptosis signaling pathway to inhibit neuroinflammation. **Methods** CUMS depression-

收稿日期: 2022-12-13

基金项目: 西南特色中药资源国家重点实验室开放研究基金项目 (2020XSGG002); 国家自然科学基金资助项目 (82074094)

作者简介: 秦甜甜, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理。E-mail: qinyankao@163.com

*通信作者: 曾 南, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理和毒理学研究。E-mail: zengnan966@126.com

刘 蓉, 教授, 研究生导师, 主要从事中药药理和毒理学研究。E-mail: liurong_1116@126.com

like model was established in male ICR mice. According to the preference rate of sugar water, the successful modeling mice were randomly divided into model group, fluoxetine (10 mg/kg) group and essential oil from *S. tenuifolia* high-, low-dose (100, 50 mg/kg) groups, and the control group was set at the same time. After five weeks of drug intervention, the sugar water preference test, forced swimming test, tail suspension test and splash test were carried out in mice. After the behavioral test, blood was taken and serum was separated, and hippocampus tissue was taken. Levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in serum were measured by ELISA. Nissl staining was used to detect the average optical density of Nissl body in hippocampal CA3 neurons. The expressions of NLRP3, cleaved cystein-aspartate protease-1 (cleaved Caspase-1), IL-1 β and ionized calcium binding adapter molecule-1 (Iba-1) in hippocampus CA3 were detected by immunofluorescence. Western blotting was used to detect the expressions of NLRP3 inflammasome and pyroptosis signaling pathway related proteins in hippocampus. **Results** Compared with model group, essential oil from *S. tenuifolia* significantly improved the preference rate of sugar water in mice ($P < 0.01$), significantly shortened the immobility time in forced swimming and tail suspension tests ($P < 0.01, 0.001$), and significantly prolonged the grooming time in splash tests ($P < 0.05$), showing the antidepressant-like behavior. The essential oil from *S. tenuifolia* significantly decreased the level of IL-1 β in serum of mice ($P < 0.05, 0.01$), increased the number of Nissl body in hippocampal CA3 area ($P < 0.05, 0.01$), weakened the average fluorescence intensity of cleaved Caspase-1, IL-1 β and Iba-1 in hippocampal CA3 area ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), downregulated NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), Caspase-1, cleaved Caspase-1, IL-1 β , pro IL-1 β , gasdermin-D (GSDMD), N-GSDMD and Iba-1 protein expressions in hippocampus ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** The essential oil from *S. tenuifolia* can improve the depression-like behavior of CUMS model mice, and has antidepressant effect. Its mechanism is related to inhibiting the activation of inflammasome of NLRP3 and pyroptosis, and inhibiting the activation of microglia, thus reducing the neuroinflammatory reaction and neuronal injury.

Key words: essential oil from *Schizonepeta tenuifolia* Briq.; depression; chronic unpredictable mild stress; neuroinflammation; NOD-like receptor pyrin domain containing 3; pyroptosis; pulegone; isomenthone; menthone; (*S*)-piperitone

抑郁症是一种常见的精神疾病，以显著而持久的情绪低落为主要临床特征，主要表现为心境低落、意志活动减退、思维迟缓和认知功能损害，同时伴有睡眠障碍、焦虑，甚者出现严重的自残或自杀行为^[1]。抑郁症的病因和发病机制复杂，且尚未完全阐明。目前认为中枢神经炎症是抑郁症发病的核心机制之一，机体长期暴露于高水平的炎性细胞因子可诱发神经系统的病变，进而可能导致抑郁障碍等神经精神疾病的发生^[2]，表现为炎症因子能促进活性氧自由基生成，直接损伤与抑郁症发病相关的脑区神经元和胶质细胞，扰乱神经内分泌功能，引起抑郁症相关的各种症状^[3-4]。临床研究发现，抑郁症患者外周血中的白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等细胞因子水平显著升高，使用抗抑郁药治疗后，上述促炎细胞因子的水平显著降低^[5]。活化的神经小胶质细胞会产生大量炎症介质，诱导神经炎症和认知障碍^[6]，其机制涉及炎症反应发生密切相关的 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3) 炎性小体激活，NLRP3 炎性小体存在于中枢神经系统的小胶质细胞和星形胶质细胞中^[7]，激活后释放炎症因子并启动下游炎症反应^[8]，诱发的

神经炎症参与神经损伤，可导致疾病和抑郁样行为。

荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 挥发油及其主要成分薄荷酮、薄荷酮具有良好的抗炎作用，能够减轻炎症损伤^[9]。左旋薄荷酮还能抑制下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenocortical, HPA) 轴过度活化，促进皮质脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 的表达，从而发挥抗抑郁作用^[10]。课题组前期研究表明，荆芥挥发油的良好抗炎效应与抑制 NLRP3 炎症小体激活有关^[11]，同时发现荆芥挥发油通过减轻神经炎症反应对脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导的抑郁样模型小鼠发挥保护作用^[12]。基于前期研究基础，结合目前中药挥发油的中枢神经系统作用的认识^[13]，本研究采用慢性温和和不可预知应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 诱导的小鼠抑郁样模型，开展荆芥挥发油的抗抑郁作用及 NLRP3/细胞焦亡通路作用机制研究，为进一步探究荆芥挥发油的抗抑郁作用及临床应用拓展提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠，5 周龄，体质量 18~20 g，购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司，合格证号 SCXK (京) 2019-0010。所有动物均自由饮食饮水，

在 24 h 明暗周期的环境中饲养,昼夜各 12 h,温度 (25±1) °C,相对湿度 40%~60%。本实验符合动物实验伦理学标准,获得成都中医药大学实验动物伦理委员会的批准(批准号 20200320)。

1.2 药材

荆芥穗 *S. tenuifolia* Briq. 购自太极大药房,批号 20210101,经成都中医药大学鉴定教研室严铸云教授鉴定符合《中国药典》2020 年版要求。

1.3 药品与试剂

盐酸氟西汀(fluoxetine, FLX)胶囊(20 mg/粒,批号 9833A)购自 Patheon France 公司;小鼠 IL-1 β 、TNF- α ELISA 试剂盒(批号分别为 E-EL-M0037C、E-EL-M3063)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0010)购自碧云天试剂公司;UltraSignal 超敏 ECL 化学发光底物(批号 4AW011-100)购自北京四正柏生物科技有限公司;二甲苯、中性树胶(批号分别为 10023418、10004160)购自国药集团化学试剂有限公司;冰醋酸(批号 G10000218)购自武汉谷歌生物科技有限公司;NLRP3 兔多克隆抗体(批号 T55655ES)购自 Abmart 公司;凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)兔多克隆抗体(批号 DF6304)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cystein-aspartate protease-1, Caspase-1)兔多克隆抗体(批号 AF5418)、cleaved Caspase-1 兔多克隆抗体(批号 AF4022)、IL-1 β 兔多克隆抗体(批号 AF4006)、gasdermin-D(GSDMD)兔多克隆抗体(批号 AF4012)、离子钙结合适配器分子-1(ionized calcium binding adapter molecule-1, Iba-1)兔多克隆抗体(批号 DF6442)均购自 Affinity 公司; β -tubulin 兔多克隆抗体(批号 GB11017B)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)兔多克隆抗体(批号 GB11002)、尼氏染液(批号 G1032)均购自塞维爾有限公司。

1.4 仪器

UPK-10T 型纯水仪(广州市优普科技有限公司);BS323S 型电子天平(德国 Sartorius 公司);3001 型酶标仪、ST16R 型冷冻离心机、Revos 型脱水机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DYY-6C 型电泳仪电源(北京市六一仪器厂);1658000 型小型垂直电泳槽、转膜槽、ChemiDoc 型免染型化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);JB-P5 型包

埋机、JB-L5 型冻台(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);KD-P 型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);GFL-230 型烤箱(天津市莱玻瑞仪器设备有限公司);ECLIPSE E100 型正置光学显微镜、DS-U3 型成像系统(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 荆芥挥发油的制备

荆芥穗打粉,以 6 倍量水浸泡 30 min 后,水蒸气蒸馏法提取挥发油,大火煮沸后微火加热至无挥发油生成为止,收集挥发油提取器中上层挥发油,无水硫酸钠脱水后避光保存,1 kg 生药经提取得到 9 mL 荆芥挥发油。荆芥挥发油经 GC-MS 检测,其主要成分有薄荷酮、异薄荷酮、薄荷酮及胡椒酮等,相对质量分数分别为 36.76%、14.39%、14.39%、2.73%^[12]。

2.2 CUMS 模型的建立、分组及给药

小鼠适应性饲养 3 d 后,按体重分层随机分为对照组和造模组,对照组小鼠合笼饲养不施加造模程序,造模组小鼠单笼饲养,并施加 CUMS 程序进行造模:冷水游泳(4 °C、5 min),空笼,夹尾(3 min),频闪灯刺激(12 h),明暗颠倒,禁食 24 h,禁水 24 h,潮湿垫料(12 h),异味刺激(3 h),束缚(3 h),鼠笼倾斜,噪音环境(60 Hz, 1 h),将以上刺激因子随机分配,每日安排 2 种单因子刺激或复合因子刺激,相邻 2 d 刺激因子不重复,使动物不能预料刺激的发生。给药期间造模程序不停止。造模前及开始造模后每周测定小鼠糖水偏好率,连续造模 6 周后,与对照组比较模型组小鼠糖水偏好率出现显著降低,提示造模成功。随后依据小鼠糖水偏好率,将造模组小鼠重新分组,使各组糖水偏好率相近且与对照组比较均有显著性差异,分为模型组、FLX(10 mg/kg,相当于成人临床日用剂量的 30 倍)组和荆芥挥发油高、低剂量(100、50 mg/kg,分别为 1/5 LD₅₀、1/10 LD₅₀)组,每组 10 只,其中荆芥挥发油的剂量设置参考其急性毒性实验结果及以往研究基础^[12]。各给药组 ig 相应药物(20 mL/kg),对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水,1 次/d,连续给药 5 周。

2.3 行为学实验

2.3.1 糖水偏好实验 糖水偏好实验前,各组小鼠给予 1 瓶白水与 1 瓶 1%蔗糖水饮用,适应一边白水、一边蔗糖水的情况。适应 12 h 后,所有小鼠单

笼饲养, 禁食禁水 12 h。每只小鼠各给予 1 瓶白水与 1 瓶 1%蔗糖水, 称定 2 只水瓶质量。在小鼠饮用白水或蔗糖水 12 h 后, 取下水瓶, 再次称定水瓶质量, 以 2 次水瓶质量差值记为小鼠白水或蔗糖水的消耗量, 计算小鼠糖水偏好率。造模前测定小鼠糖水偏好率基础值, 造模开始后每周固定时间测定小鼠糖水偏好率 1 次。

糖水偏好率 = 蔗糖水消耗量 / (白水消耗量 + 蔗糖水消耗量)

2.3.2 强迫游泳、悬尾实验 参考文献方法^[14-15], 各组小鼠于处理前 1 周进行实验。

(1) 强迫游泳实验: 在高 30 cm、直径 20 cm 的圆柱型透明器皿中注入 20 cm 深清水, 温度 (25 ± 2) °C。将小鼠置于器皿内, 计时 6 min, 前 2 min 使其适应性游泳, 记录后 4 min 内累积不动时间。

(2) 悬尾实验: 将小鼠尾部后 2 cm 处用胶带固定在水平位置, 使其呈倒挂状态, 头部离下水平面 5~6 cm, 记录动物在 6 min 内后 4 min 的累积不动时间。

2.3.3 飞溅实验 将 10% 的蔗糖水连续 3 次喷于小鼠背部靠近尾端处。之后放入小鼠原本居住的笼中记录 5 min 内小鼠的梳洗时间 (小鼠梳洗背部喷洒糖水位置的行为时间记为梳洗时间), 于取材前 1 周进行测定。

2.4 ELISA 检测血清炎症因子水平

行为学测试完毕后, 小鼠眼球取血, 室温静置 2 h, 3500 r/min 离心 10 min (离心半径 7.5 cm), 分离血清, 按试剂盒说明书测定血清中 IL-1 β 及 TNF- α 水平。

2.5 尼氏染色检测海马 CA3 区尼氏小体

取小鼠大脑组织固定于 4% 多聚甲醛中, 常规方法脱水、透明、浸蜡并包埋。取小鼠全脑蜡块切片 (3 μ m), 烘干后将切片放入二甲苯 I 20 min、二甲苯 II 20 min、无水乙醇 I 5 min、无水乙醇 II 5 min、75% 乙醇 5 min, 水洗。甲苯胺蓝染色 45 min, 水洗, 0.1% 冰醋酸分化, 水洗终止反应, 显微镜下控制分化程度, 水洗后置于 60 °C 烤箱烘干。切片于二甲苯透明 5 min, 中性树胶封片。置于显微镜下拍照, 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行图像分析, IDO 法检测海马 CA3 区尼氏小体平均吸光度 (A) 值。

2.6 免疫荧光法检测小鼠海马 CA3 区 NLRP3、cleaved Caspase-1、IL-1 β 和 Iba-1 的表达

取各组小鼠脑组织脱水、包埋、切片 (约 3 μ m),

切片常规脱蜡至水, 用柠檬酸缓冲液进行抗原修复。PBS 溶液 (pH 7.4) 洗涤后用组化笔画圈, 在圈内加入自发光淬灭剂后流水冲洗。牛血清白蛋白封闭 30 min 后, 滴加 PBS 配制的一抗, 切片平放于湿盒内 4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤后滴加与一抗相应种属的二抗覆盖组织, 避光室温孵育 50 min。切片于荧光显微镜下观察并采集图像, 使用 CaseViewer 4.0 扫描浏览软件选取组织的目的区域对海马 CA3 区进行成像, 应用 Image J 软件分析平均荧光强度。

2.7 Western blotting 检测海马组织 NLRP3/细胞焦亡通路相关蛋白表达

称取各组小鼠海马组织 20 mg, 加入 RIPA 裂解液 200 μ L 匀浆、裂解, 12 000 $\times g$ 离心 10 min 后, 取上清液, BCA 法测定总蛋白浓度, 调整蛋白浓度一致后, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶室温封闭 1.5 h, 洗膜后分别加入 NLRP3、ASC、GSDMD、Caspase-1、cleaved Caspase-1、IL-1 β 、Iba-1 (1 : 1000) 兔抗, 4 °C 孵育过夜; 洗膜后孵育二抗 (1 : 5000), 洗膜后在凝胶成像系统中成像, Image Lab 凝胶图像分析系统分析条带灰度值。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行实验数据统计, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量数据符合正态性分布的采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 或 t 检验, 不符合正态者则采用非参数检验法分析。

3 结果

3.1 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠行为学的影响

3.1.1 糖水偏好率 如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠糖水偏好率显著降低 ($P < 0.05$), 提示动物快感缺失, 出现抑郁样行为, 表明造模成功。

表 1 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠糖水偏好率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of essential oil from *S. tenuifolia* on preference rate of sugar water in CUMS model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	糖水偏好率/%
对照	—	10	65.5 ± 11.6
模型	—	8	47.2 ± 10.1 [#]
FLX	10	9	59.7 ± 12.8 ^{**}
荆芥挥发油	50	9	61.5 ± 8.1 ^{**}
	100	8	63.3 ± 11.3 ^{**}

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

^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 下表同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as below tables

与模型组比较, 各给药组小鼠糖水偏好率显著升高 ($P<0.01$), 表明荆芥挥发油能够改善模型小鼠快感缺失的行为异常表现, 表现出抗抑郁作用。

3.1.2 强迫游泳、悬尾实验不动时间及飞溅实验梳洗时间 如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠游泳及悬尾实验中的不动时间分别延长 ($P<0.05$), 飞溅实验中小鼠梳洗时间缩短 ($P<0.01$), 表明 CUMS 模型小鼠出现行为学异常。与模型组比较,

各给药组小鼠悬尾和强迫游泳实验中的不动时间明显缩短 ($P<0.01$ 、 0.001), 梳洗时间延长 ($P<0.05$)。

3.2 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠血清炎症因子水平的影响

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清 IL-1 β 水平明显升高 ($P<0.05$), TNF- α 呈升高趋势; 与模型组比较, 各给药组小鼠血清 IL-1 β 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), TNF- α 呈降低趋势。

表 2 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠行为学表现的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of essential oil from *S. tenuifolia* on behavioral performance in CUMS model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	悬尾不动时间/s	n/只	梳洗时间/s	n/只	游泳不动时间/s
对照	—	9	41.5±21.1	10	140.4±25.0	9	141.7±31.8
模型	—	8	67.2±24.4 [#]	9	92.7±35.3 ^{##}	8	162.3±30.9 [#]
FLX	10	10	33.3±13.7 ^{***}	9	129.5±33.4 [*]	8	119.6±48.0 [*]
荆芥挥发油	50	10	26.4±25.8 ^{**}	8	130.8±36.3 [*]	9	88.7±38.9 ^{***}
	100	9	31.3±23.4 ^{**}	8	131.3±37.8 [*]	10	95.8±36.6 ^{**}

表 3 荆芥挥发油对 CUMS 小鼠血清中 IL-1 β 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of essential oil from *S. tenuifolia* on IL-1 β and TNF- α levels in serum of CUMS model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	n/只	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	7	6.28±7.52	6	15.83±3.28
模型	—	7	18.76±11.69 [#]	6	34.25±21.30
FLX	10	7	5.84±5.06 [*]	6	17.35±4.80
荆芥挥发油	50	7	5.85±3.75 [*]	6	28.80±8.28
	100	7	2.05±1.86 ^{**}	6	21.60±5.74

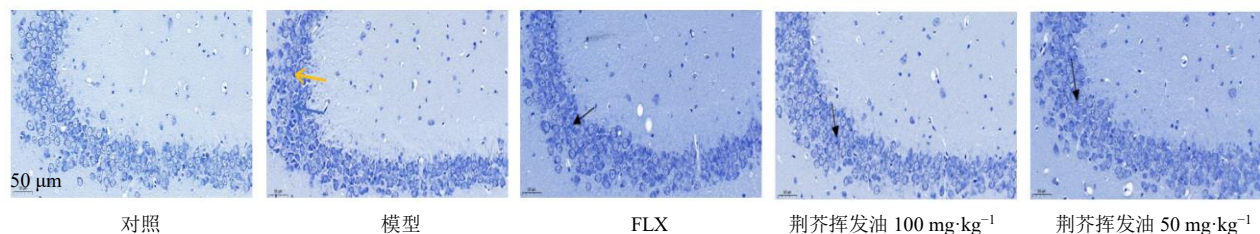
3.3 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠海马 CA3 区尼氏小体的影响

如图 1 所示, 对照组小鼠海马神经元尼氏体丰富, 着色明显, 排列整齐, 神经元细胞形态结构较好。与对照组比较, 模型组小鼠海马 CA3 区神经元细胞排列不佳, 细胞间间隙增宽, 胞体多角形变小改变明显, 海马神经元细胞皱缩, 胞质尼氏体数量

减少。与模型组比较, 各给药组海马 CA3 区神经元形态结构正常, 胞质尼氏体丰富呈蓝染颗粒状, 染色比较清晰, 排列较为整齐。如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组尼氏小体数量明显减少 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组尼氏小体数量均显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01), 说明荆芥挥发油可以通过发挥神经保护作用对抗动物的抑郁样行为。

3.4 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠海马 CA3 区 NLRP3、cleaved Caspase-1、IL-1 β 及 Iba-1 表达的影响

如图 2 和表 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马 CA3 区 NLRP3、cleaved Caspase-1 及 Iba-1 的荧光强度显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), IL-1 β 有升高趋势, 提示小胶质细胞的激活及炎症反应启动; 与模型组比较, 各给药组 cleaved Caspase-1 和 Iba-1 荧光强度显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), FLX 组



黄箭头表示海马神经元细胞皱缩, 蓝箭头表示胞质尼氏体数量减少, 黑箭头表示胞质尼氏体丰富呈蓝染颗粒状

yellow arrow indicates that hippocampal neurons shrink, blue arrow indicates that the number of cytoplasmic Nissl bodies decreases, and black arrow indicates that the cytoplasmic Nissl bodies are abundant and blue-stained

图 1 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠海马 CA3 区尼氏小体的影响 ($\times 400$)

Fig. 1 Effect of essential oil from *S. tenuifolia* on Nissl body in hippocampus CA3 area of CUMS model mice ($\times 400$)

表 4 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠海马 CA3 区尼氏小体的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 Effect of essential oil from *S. tenuifolia* on Nissl body in hippocampus CA3 area of CUMS model mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	平均 A 值
对照	—	25.38±9.45
模型	—	14.10±3.20 ^{##}
FLX	10	23.70±6.39 ^{**}
荆芥挥发油	50	22.40±8.21 [*]
	100	34.20±4.06 ^{**}

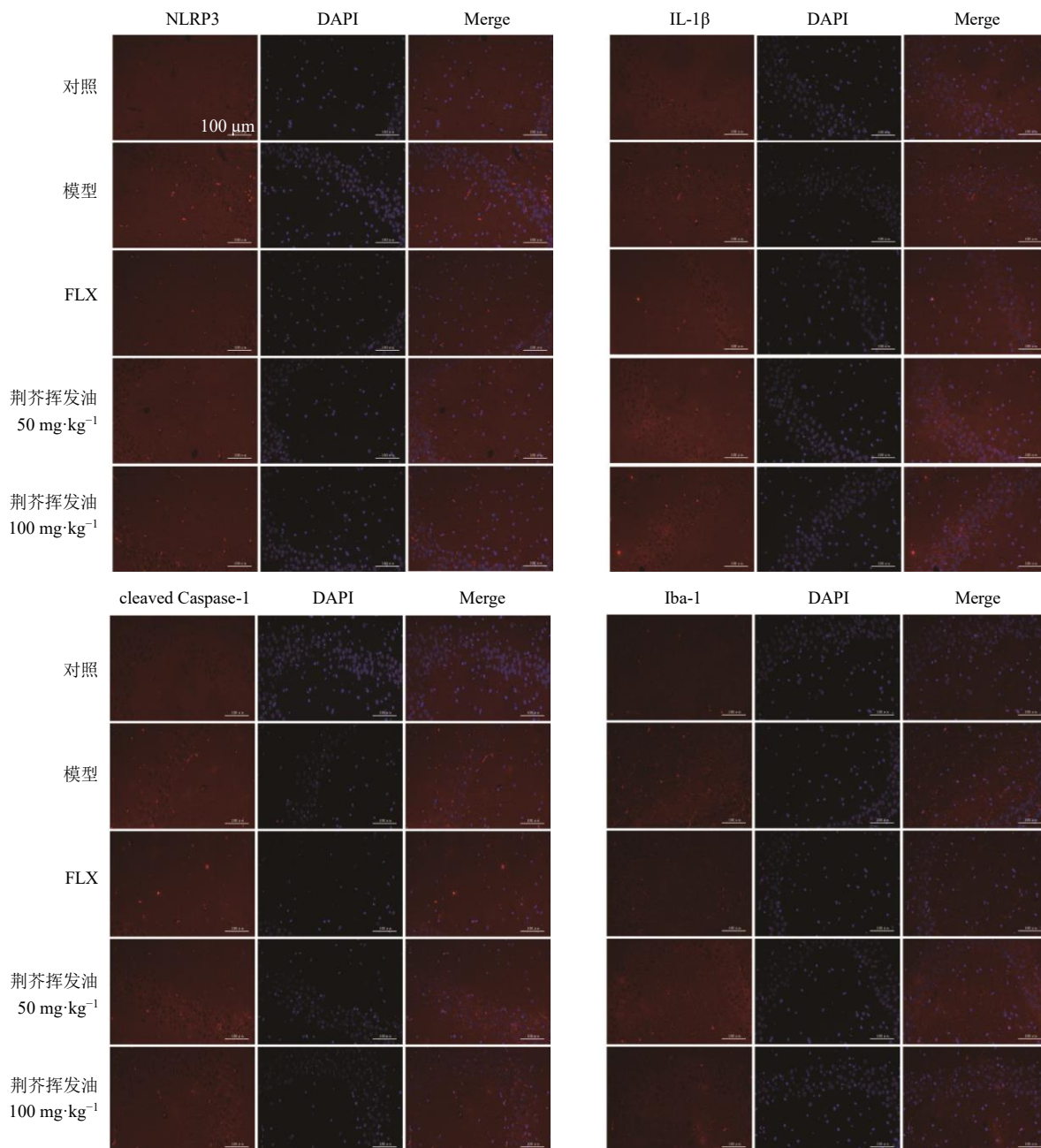


图 2 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠海马 CA3 区 NLRP3、cleaved Caspase-1、IL-1β 及 Iba-1 表达的影响 (×200)

Fig. 2 Effect of essential oil from *S. tenuifolia* on NLRP3, cleaved Caspase-1, IL-1β and Iba-1 expressions in hippocampus CA3 area of CUMS model mice (× 200)

NLRP3 荧光强度显著降低 ($P < 0.05$), FLX 组和荆芥挥发油高剂量组 IL-1β 荧光强度显著降低 ($P < 0.05$)。

3.5 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠海马组织 NLRP3/细胞焦亡通路相关蛋白表达的影响

如图 3 和表 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马组织 NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、IL-1β、pro IL-1β、ASC、GSDMD、N-GSDMD 和 Iba-1 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 提示

表 5 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠海马 CA3 区 NLRP3、cleaved Caspase-1、IL-1 β 及 Iba-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 5 Effect of essential oil from *S. tenuifolia* on NLRP3, cleaved Caspase-1, IL-1 β and Iba-1 expressions in hippocampus CA3 area of CUMS model mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	平均荧光强度/%			
		NLRP3	cleaved Caspase-1	IL-1 β	Iba-1
对照	—	5.43 ± 0.24	5.32 ± 0.13	5.40 ± 0.06	6.33 ± 0.17
模型	—	5.93 ± 0.33 [#]	5.67 ± 0.24 ^{##}	5.65 ± 0.17	6.50 ± 0.11 [#]
FLX	10	5.47 ± 0.20 [*]	5.47 ± 0.12 [*]	5.46 ± 0.08 [*]	6.01 ± 0.17 ^{***}
荆芥挥发油	50	5.57 ± 0.53	5.32 ± 0.12 ^{**}	5.55 ± 0.17	5.77 ± 0.17 ^{***}
	100	5.63 ± 0.52	5.36 ± 0.17 ^{**}	5.43 ± 0.14 [*]	5.81 ± 0.09 ^{***}

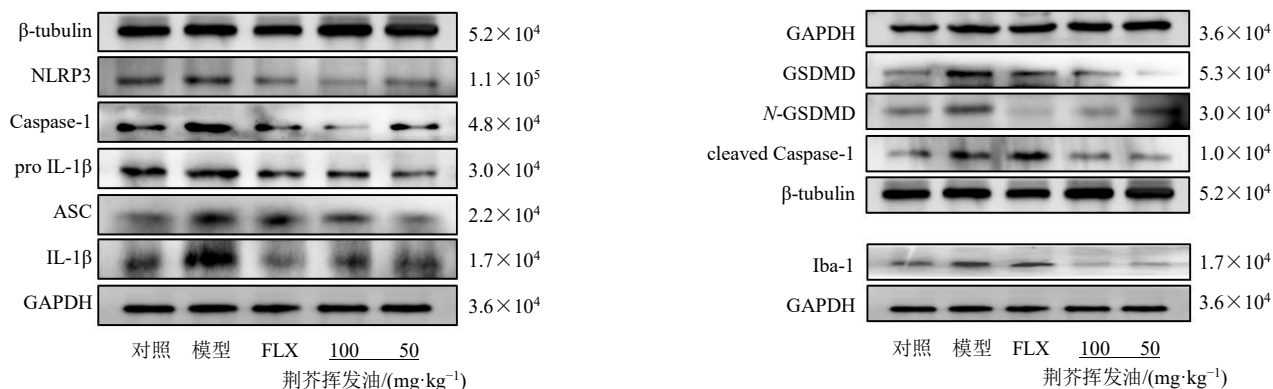


图 3 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠海马组织 NLRP3/细胞焦亡通路相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of essential oil from *S. tenuifolia* on NLRP3/pyroptosis pathway related protein expressions in hippocampus of CUMS model mice

表 6 荆芥挥发油对 CUMS 模型小鼠海马组织 NLRP3/细胞焦亡通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 6 Effect of essential oil from *S. tenuifolia* on NLRP3/pyroptosis pathway related protein expressions in hippocampus of CUMS model mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	NLRP3/ β-tubulin	Caspase-1/ GAPDH	cleaved Caspase-1/ β-tubulin	IL-1 β / GAPDH	pro IL-1 β / GAPDH
对照	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	—	1.66 ± 0.64 [#]	2.28 ± 0.95 ^{##}	1.46 ± 0.33 [#]	1.63 ± 0.35 ^{##}	1.83 ± 0.66 [#]
FLX	10	0.81 ± 0.41 [*]	0.78 ± 0.50 ^{**}	1.36 ± 0.24	1.09 ± 0.53 [*]	0.68 ± 0.33 [*]
荆芥挥发油	50	0.97 ± 0.43 [*]	0.83 ± 0.24 ^{**}	0.77 ± 0.21 ^{**}	0.69 ± 0.22 ^{***}	0.68 ± 0.17 [*]
	100	0.87 ± 0.41 [*]	0.86 ± 0.38 ^{**}	0.88 ± 0.10 ^{**}	0.88 ± 0.35 ^{**}	0.87 ± 0.36

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ASC/ GAPDH	GSDMD/ β-tubulin	N-GSDMD/ GAPDH	Iba-1/ GAPDH
对照	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	—	1.78 ± 0.50 [#]	2.21 ± 1.09 [#]	1.51 ± 0.47 [#]	1.90 ± 0.39 ^{##}
FLX	10	1.07 ± 0.12 [*]	0.65 ± 0.39 [*]	0.95 ± 0.43 [*]	1.76 ± 0.74
荆芥挥发油	50	0.70 ± 0.26 ^{**}	0.44 ± 0.27 ^{**}	1.05 ± 0.26 [*]	0.78 ± 0.29 ^{**}
	100	1.22 ± 1.04	0.44 ± 0.19 ^{**}	0.86 ± 0.35 ^{**}	0.66 ± 0.32 ^{***}

CUMS 模型小鼠海马组织中小胶质细胞活化且 NLRP3 炎症小体被激活, 细胞焦亡发生, 引起小鼠海马部位的神经炎症。与模型组比较, 各给药组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、GSDMD、N-GSDMD、蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 荆芥挥发油各剂量组 cleaved Caspase-1、Iba-1 蛋白

表达水平均明显降低 ($P < 0.01$ 、0.001), FLX 组和荆芥挥发油低剂量组 pro IL-1 β 、ASC 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明荆芥挥发油能对抗模型小鼠海马组织中小胶质细胞的活化, 同时抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 抑制细胞焦亡, 从而减少炎症因子释放。

4 讨论

传统中药挥发油(精油)依赖于其独特的芳香气味、易透过血脑屏障、多靶点、不良反应少等特点,通过抗焦虑、抗抑郁、镇静安神、神经保护等多种药理活性,在防治抑郁、焦虑等情志疾病上呈现出独特优势^[13]。荆芥挥发油作为荆芥的主要物质基础,已被证明具有良好的抗炎、抗病毒、抗肿瘤、解热镇痛等作用^[16],且前期研究亦表明其抗炎作用与其对抗 LPS 所致的抑郁样模型小鼠行为学异常有关^[12],因此究其抗抑郁效应,值得进一步探究。

CUMS 抑郁模型模仿了人类抑郁症的发生和发病机制,被认为是较为理想的动物抑郁模型^[17-20]。接触重复应激的动物糖水消耗会减少,出现快感缺乏迹象,因此糖水偏好实验可用于评价抑郁程度^[21-22]。飞溅实验主要观察动物是否出现行为淡漠状态。本实验结果表明,CUMS 造模后,小鼠糖水偏好率降低,提示 CUMS 抑郁模型构建成功。荆芥挥发油连续给药 5 周,能明显提高糖水偏好率,显著缩短小鼠悬尾与强迫游泳实验中不动时间,延长飞溅实验中的梳洗时间,结合小鼠行为绝望抑郁模型的结果,表明荆芥挥发油具有抗抑郁作用。

近年来研究认为,压力增加会引起外周和中枢神经系统中的促炎细胞因子释放,以及大脑中小胶质细胞的激活,特征表现为细胞表面标志物 Iba-1 的增加。IL-1 β 和 TNF- α 作为炎症介质在细胞信号传导中发挥重要作用,自身也会影响神经递质系统、大脑功能和情绪^[23],与抑郁症的发生、发展较为密切^[24]。本研究结果发现,CUMS 模型小鼠血清中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 水平升高,小鼠海马 CA3 区 Iba-1 蛋白表达上调,提示小胶质细胞被激活,荆芥挥发油则能显著对抗上述变化,表明药物能抑制小胶质细胞激活,减少炎症因子释放,从而抑制神经炎症来发挥抗抑郁作用。当神经元长期受到应激或受损时,尼氏体会减少、解体甚至消失,常被用于评估神经元损伤表现^[25]。与模型组小鼠比较,荆芥挥发油治疗后能减轻小鼠海马 CA3 区神经元形态病理表现,增加尼氏小体数目,提示药物对 CUMS 造模导致的海马神经元损伤有保护作用。

研究认为,抑郁症的神经炎症反应病理机制与小胶质细胞功能变化、Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)以及 NLRPs 等信号通路有关^[26],其中 NLRP3 炎症小体被证实参与了抑郁症的发病机制^[27]。NLRP3 作为炎症小体的核心蛋白,组装

ASC 和 Caspase-1 形成 NLRP3 炎症小体,NLRP3 炎症小体被激活后,cleaved Caspase-1 切割 GSDMD 中 N 端和 C 端结构域之间的接头,然后 N 端 GSDMD 结构域片段易位到质膜形成膜孔,导致细胞裂解死亡或通过孔分泌成熟状态的 IL-1 β 、IL-18,诱导一系列炎症反应,最终引起细胞焦亡^[28-29]。本研究结果发现,CUMS 抑郁模型小鼠海马组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、pro IL-1 β 蛋白表达水平显著上调,免疫荧光法同样表明 NLRP3、IL-1 β 蛋白表达量增加,提示模型小鼠海马组织 NLRP3 炎症小体被激活,致使炎症因子增加;进一步检测发现 GSDMD、N-GSDMD、cleaved Caspase-1 表达量增加,提示出现细胞焦亡,进而导致神经元的损伤。研究结果也证实了抑郁症的发生与 NLRP3 炎症小体激活、细胞焦亡发生密切相关。荆芥挥发油治疗后,上述蛋白的表达量均呈现下调的表现,表明荆芥挥发油能通过抑制 NLRP3 炎症小体激活及细胞焦亡发生,从而减轻神经损伤来发挥抗抑郁作用。

综上,本研究证实了荆芥挥发油的抗抑郁作用,并提示其抗抑郁作用与抑制 NLRP3 炎症小体激活及细胞焦亡、抑制小胶质细胞活化、降低炎症因子表达等有关。研究结果丰富并拓展了荆芥挥发油良好抗炎作用的应用依据,明确了该挥发油的抗抑郁作用表现。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘志恒,袁霞红,刘林. 抑郁症动物模型及其在中医药研究运用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 109-114.
- [2] 杨永涛,崔利军. 抑郁症与炎症因子及辅助抗炎治疗的研究进展 [J]. 神经疾病与精神卫生, 2021, 21(2): 108-113.
- [3] 杨会增,杨程皓. 抑郁症抗炎治疗的研究进展 [J]. 临床精神医学杂志, 2022, 32(6): 492-496.
- [4] Haroon E, Daguanno A W, Woolwine B J, et al. Antidepressant treatment resistance is associated with increased inflammatory markers in patients with major depressive disorder [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, 95: 43-49.
- [5] Li M M, Wang X, Chen X D, et al. Lysosomal dysfunction is associated with NLRP3 inflammasome activation in chronic unpredictable mild stress-induced depressive mice [J]. *Behav Brain Res*, 2022, 432: 113987.
- [6] Liu D, Lv F, Min S, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation alleviates

- electroconvulsive shock-induced memory impairment via regulation of hippocampal synaptic plasticity in depressive rats [J]. *Behav Brain Res*, 2022, 428: 113879.
- [7] Song L M, Pei L, Yao S L, *et al.* NLRP3 inflammasome in neurological diseases, from functions to therapies [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 63.
- [8] Chai Y H, Cai Y W, Fu Y, *et al.* Salidroside ameliorates depression by suppressing NLRP3-mediated pyroptosis via P2X7/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 812362.
- [9] 苏畅, 赵艳云, 冯媛, 等. 荆芥叶及穗的抗菌效果和成分分析 [J]. 中国新药杂志, 2022, 31(11): 1103-1111.
- [10] 薛劲松, 李鸿雁, 傅强, 等. 左旋薄荷酮抗抑郁作用及机制研究 [J]. 药学与临床研究, 2015, 23(3): 238-241.
- [11] 吕红君, 温桃群, 罗杰, 等. 荆芥挥发油抗内毒素中毒小鼠 NLRP3 炎症小体通路的机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(3): 371-376.
- [12] 秦甜甜, 谢红潇, 胡靖文, 等. 基于网络药理学及实验验证探究荆芥挥发油治疗抑郁症的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(4): 1066-1075.
- [13] 李慧婷, 李远辉, 任桂林, 等. 中药挥发油防治情志疾病的研究现状及前景展望 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4031-4040.
- [14] 瞿礼萍, 周桢昊, 曾南, 等. 逍遥散及其拆方对行为绝望模型小鼠的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 38-39.
- [15] 张业, 杨新年, 李霏, 等. 酸枣仁汤对行为绝望小鼠模型的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(10): 2136-2137.
- [16] 刘英男, 牛凤菊, 辛义周, 等. 荆芥的化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国药房, 2020, 31(11): 1397-1402.
- [17] Zhang X P, Li Z, Shen C P, *et al.* Tao-Hong-Si-Wu Decoction improves depressive symptoms in model rats via amelioration of BDNF-CREB-arginase I axis disorders [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 1739-1750.
- [18] Liu X J, Li Z Y, Li Z F, *et al.* Urinary metabonomic study using a CUMS rat model of depression [J]. *Magn Reson Chem*, 2012, 50(3): 187-192.
- [19] Peng Z L, Zhang C, Yan L, *et al.* EPA is more effective than DHA to improve depression-like behavior, glia cell dysfunction and hippocampal apoptosis signaling in a chronic stress-induced rat model of depression [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1769.
- [20] 林映仙, 杨文静, 曹宁宁, 等. 逍遥散及其加减方的抗抑郁作用比较研究 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 137-144.
- [21] Song J, Kim Y K. Animal models for the study of depressive disorder [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(6): 633-642.
- [22] Belovicova K, Bogi E, Csatosova K, *et al.* Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats [J]. *Interdiscip Toxicol*, 2017, 10(1): 40-43.
- [23] Wang Y L, Wu H R, Zhang S S, *et al.* Catalpol ameliorates depressive-like behaviors in CUMS mice via oxidative stress-mediated NLRP3 inflammasome and neuroinflammation [J]. *Transl Psychiatry*, 2021, 11: 353.
- [24] 吴媛媛, 李春燕, 吴玲玲, 等. NLRP3 炎症小体在抑郁症中应用的研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2021, 37(13): 2222-2226.
- [25] Zeng J S, Ji Y F, Luan F, *et al.* Xiaoyaosan ethyl acetate fraction alleviates depression-like behaviors in CUMS mice by promoting hippocampal neurogenesis via modulating the IGF-1R β /PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 288: 115005.
- [26] 何沙潼, 蒋梦若, 陈嘉豪, 等. 抑郁的中枢神经炎症机制相关研究进展 [J]. 生命的化学, 2022, 42(7): 1315-1321.
- [27] Zhang S S, Zong Y, Ren Z G, *et al.* Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hippocampal microglia by NLRP3 inflammasome in lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors [J]. *Eur J Neurosci*, 2020, 52(11): 4586-4601.
- [28] Zhang J, Huang L L, Shi X, *et al.* Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Aging*, 2020, 12(23): 24270-24287.
- [29] Tian D D, Wang M, Liu A, *et al.* Antidepressant effect of paeoniflorin is through inhibiting pyroptosis CASP-11/GSDMD pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(2): 761-776.

[责任编辑 李亚楠]