

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

曹珊珊, 史磊磊, 张雨涵, 史永恒, 韩朝军*, 王 斌, 刘继平*

陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

摘要: **目的** 通过细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (cyclic adenosine monophosphate response binding protein, CREB)/脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 信号通路及肠道菌群探究滋水清肝饮对慢性束缚应激制备的小鼠抑郁模型的干预作用。**方法** 除对照组外, 建立慢性束缚应激模型, 造模 21 d 后根据糖水偏好实验结果随机分成模型组、盐酸氟西汀 (0.01 g/kg) 组和滋水清肝饮低、中、高剂量 (8.835、17.670、35.340 g/kg) 组。每周给药结束后进行糖水偏好实验及行为学实验。苏木素-伊红 (HE) 染色观察小鼠全脑及结肠病理变化; 免疫荧光染色检测海马小胶质细胞标志物离子钙结合衔接分子-1 (ionized calcium binding adapter molecule-1, Iba-1) 荧光强度; 检测小鼠血清中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase) 活性及丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、促肾上腺皮质激素释放激素 (corticotropin releasing hormone, CRH)、皮质酮 (corticosterone, CORT) 水平; 检测小鼠前额叶皮层中 SOD 活性及 BDNF、5-HT、MDA 水平; 通过 16S rRNA 基因测序检测小鼠结肠肠道内容物的组成和结构; 检测小鼠前额叶皮层组织中 ERK1/2、p-ERK1/2、CREB、p-CREB、BDNF 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 滋水清肝饮组小鼠糖水偏好率显著升高 ($P<0.01$), 悬尾实验和强迫游泳实验不动时间显著缩短 ($P<0.05$ 、 0.01), 血清中 MDA 及 ACTH、CRH 及 CORT 含量降低 ($P<0.05$ 、 0.01), SOD 活性及 5-HT 含量升高 ($P<0.05$ 、 0.01); 前额叶皮层中 BDNF、5-HT 含量及 SOD 活性增加 ($P<0.05$ 、 0.01), MDA 含量降低 ($P<0.01$); 海马 CA1 区、皮层及结肠组织中病理情况改善, 海马中 CA1 区 Iba-1 荧光强度减弱; 各给药组肠道菌群中益生菌拟杆菌门、放线菌门、杜氏杆菌属、乳杆菌属、毛螺菌属等丰度增加, 有害菌厚壁菌门、变形杆菌门、幽门螺杆菌属等丰度降低; 前额叶皮层组织中 p-ERK1/2、p-CREB、BDNF 蛋白表达均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** 滋水清肝饮明显改善慢性束缚应激小鼠的抑郁样行为, 其机制可能与调控 ERK/CREB/BDNF 通路及小鼠肠道菌群组成有关。

关键词: 滋水清肝饮; 抑郁症; 慢性束缚应激模型; 肠道菌群; ERK/CREB/BDNF 通路; 马钱苷; 阿魏酸; 芍药苷; 柴胡皂苷 A
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)02-0489-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.014

Effect of Zishui Qinggan Yin on ERK/CREB/BDNF pathway and gut microbiota in chronic restraint stress depression mice

CAO Shanshan, SHI Leilei, ZHANG Yuhan, SHI Yongheng, HAN Chaojun, WANG Bin, LIU Jiping

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

Abstract: **Objective** To investigate the intervention effect of Zishui Qinggan Yin (滋水清肝饮) on depression model of mice prepared by chronic restraint stress through extracellular regulated protein kinase (ERK)/cyclic adenosine monophosphate response binding protein (CREB)/brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling pathway and gut microbiota. **Methods** Except the control group, other mice were induced to establish the chronic restraint stress model. After 21 d of modeling, mice were randomly divided into model group, fluoxetine hydrochloride (0.01 g/kg) group, Zishui Qinggan Yin low-, medium- and high-dose (8.835, 17.67, 35.34 g/kg) groups according to the results of sucrose preference test. The sucrose preference test and behavioral test were conducted

收稿日期: 2023-07-12

基金项目: 陕西省中医药管理局科研项目 (2021-ZZ-JC003); 陕西省教育厅专项科研计划项目 (21JK0607); 陕西省自然科学基金研究计划项目 (2022JQ-918); 陕西省陕西中医药大学校级科研课题项目 (2021GP25)

作者简介: 曹珊珊 (1999—), 女, 硕士, 研究方向为中药神经药理学。E-mail: 2297660423@qq.com

*通信作者: 韩朝军 (1990—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药神经药理学。E-mail: hanchaojun@sntcm.edu.cn

刘继平 (1978—), 男, 博士, 教授, 研究生导师, 研究方向为中药神经药理学。E-mail: liwenjie780711@163.com

after weekly administration. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of the whole brain and colon of mice. The fluorescence intensity of ionized calcium binding adapter molecule-1 (Iba-1), a marker of microglia cells in hippocampus, was determined by immunofluorescence staining. Superoxide dismutase (SOD) activity, malonaldehyde (MDA), 5-hydroxytryptamine (5-HT), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticotropin releasing hormone (CRH) and corticosterone (CORT) levels in serum were detected. BDNF, 5-HT, MDA levels and SOD activity in frontal cortex of mice were detected. The composition and structure of gut microbiota in colon of mice were examined by 16S rRNA gene sequencing. The expressions of ERK1/2, p-ERK1/2, CREB, p-CREB and BDNF in prefrontal cortex tissue of mice were detected. **Results** Compared with model group, sucrose preference rate of mice in Zishui Qinggan Yin group was increased ($P < 0.01$), immobility time of tail suspension experiment and forced swimming experiment was significantly shortened ($P < 0.05, 0.01$), the contents of MDA, ACTH, CRH and CORT in serum were decreased ($P < 0.05, 0.01$), SOD activity and 5-HT content were increased ($P < 0.05, 0.01$); The contents of BDNF, 5-HT and SOD activity were increased in prefrontal cortex of mice ($P < 0.05, 0.01$), the content of MDA was decreased ($P < 0.01$); The pathological conditions in CA1 region of hippocampus, cortex and colon tissue were improved, the fluorescence intensity of Iba-1 in CA1 region of hippocampus was decreased; The abundances of probiotics Bacteroidota, Actinobacteria, *Dubosiella*, *Lactobacillus* and *Lachnospiraceae* were increased, while the abundance of harmful bacteria Firmicutes, Proteobacteria and *Helicobacter pylori* were decreased; The expressions of p-ERK1/2, p-CREB and BDNF protein in prefrontal cortex tissue of mice were increased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Zishui Qinggan Yin significantly improves depressive like behavior in chronic restraint stress mice, and its mechanism may be related to the regulation of ERK/CREB/BDNF pathway and the composition of gut microbiota in mice.

Key words: Zishui Qinggan Yin; depression; chronic restraint stress model; gut microbiota; ERK/CREB/BDNF signaling pathway; loganin; ferulic acid; paeoniflorin; saikosaponin A

重度抑郁症 (major depressive disorder, MDD) 又称抑郁障碍, 是一种常见的精神疾病, 其特征是情绪低落、兴趣减退和快乐感减退, 发病率为 6.4%~10.4%^[1-2], 严重降低患者生活质量, 使预期寿命缩短近 10 年^[3]。据《医学正传》记载, 中医最早以“郁证”为该疾病名称, 认为情志内伤为郁证主要因素, 脏器虚弱为发病的内在原因, 中医临床多配以疏肝、解郁和理气药来治疗郁证^[4]。近几十年来, 抑郁症引起的全球疾病负担一直在增加, 已成为全球残疾的主要原因之一^[5], 且对 MDD 的临床治愈率仅有 27%^[6], 已经成为严重的医学与社会难题。因此, 寻找有效防治抑郁症的措施, 对降低其发病率, 提高治疗率、提升生活质量、减轻医疗费用负担具有重要意义。

滋水清肝饮源自清代名医高鼓峰所著《医宗己任编·四明心法》^[7], 为六味地黄汤和丹栀逍遥散的化裁方, 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”。全方共 11 味药, 具有滋肾养阴、清泻肝火之效, 可用于临床治疗抑郁、失眠等精神类疾病。在临床治疗时发现, 滋水清肝饮能有效改善患者抑郁状况^[8], 减轻氧化应激及炎症^[9-10]。根据临床研究发现, 抑郁症患者的肠道菌群发生改变^[11], 40%~60%的抑郁症患者下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 轴出现紊乱^[12], 患者外周血

脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 含量降低^[13], 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 合成减少。基于以上临床研究基础, 本研究利用慢性束缚应激 (chronic restraint stress, CRS) 建立小鼠 MDD 模型, 观察超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、5-HT、促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、促肾上腺皮质激素释放激素 (corticotropin releasing hormone, CRH)、皮质酮 (corticosterone, CORT) 水平以及肠道微生物群的组成和结构, 进一步研究其作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL 小鼠 54 只, 6~8 周, 体重 (20±2) g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 动物许可证号 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, 动物饲养于陕西中医药大学中药药理实验动物房。动物实验获得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

滋水清肝饮 (熟地黄 10 g、柴胡 6 g、泽泻 10 g、山茱萸 10 g、山药 10 g、茯苓 10 g、当归 10 g、牡丹皮 10 g、酸枣仁 10 g、白芍 10 g、栀子 10 g) 饮片均购自陕西中医药大学附属医院, 经陕西中医药大

药学院中药鉴定教研室颜永刚教授分别鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根的炮制加工品、伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC 的干燥根、泽泻科植物泽泻 *Alisma plantago-aquatica* Linn. 的干燥块茎、山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉、薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥根茎、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮、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、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、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 药品与试剂

盐酸氟西汀(批号 33323)购自美国 MCE 公司; 5-HT 试剂盒(批号 20221214)、CRH 试剂盒(批号 20221020)、ACTH 试剂盒(批号 20221020)、CORT 试剂盒(批号 20221020)、BDNF 试剂盒(批号 20221104)购自上海酶联生物科技有限公司; MDA 试剂盒(批号 20230507)、SOD 试剂盒(批号 20230508)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号 20230307)均购自南京建成生物工程研究所; 细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2) 抗体(批号 00115457)、p-ERK1/2 抗体(批号 00106696)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体(批号 10017731)购自美国 Proteintech 公司; 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (cyclic adenosine monophosphate response binding protein, CREB) 抗体(批号 4000000113)、p-CREB 抗体(批号 5500015117)购自美国 Abclonal 公司; 羊抗小鼠二抗(BA1050)、羊抗兔二抗(批号 BA1051)、BDNF 抗体(批号 GB11559)、Iba-1 抗体(批号 GB113502-100)、超敏 ECL 化学发光液(批号 AR1197)购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 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(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 滋水清肝饮的制备

滋水清肝饮总方 106 g, 按照处方配比称取药材, 先用 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, 再加 8 倍量水, 武火煮沸后转文火慢煎 40 min, 合并滤液后浓缩为生药量为 2 g/mL 的液体。滋水清肝饮方中, 山茱萸、山药为君药, 白芍、柴胡为臣药, 其主要成分有马钱苷、阿魏酸、芍药苷及柴胡皂苷。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马钱苷、阿魏酸、芍药苷、柴胡皂苷 A 的质量分数分别为 $(0.2217 \pm 0.0083) \%$ 、 $(0.0185 \pm 0.0005) \%$ 、 $(0.9635 \pm 0.0025) \%$ 、 $(0.3327 \pm 0.0025) \%$ 。

2.2 动物分组、造模及给药

小鼠适应性喂养 7 d, 对照组 9 只不做处理, 造模组 45 只采用自制打孔离心管对小鼠进行 21 d 慢性束缚应激处理, 每天定时将小鼠禁锢于安静昏暗的环境 6 h^[14-15]。造模结束后, 对全部小鼠进行糖水偏好实验。根据小鼠糖水偏好结果对造模组小鼠进行随机分组, 分别为模型组、盐酸氟西汀(0.01 g/kg)组和滋水清肝饮低、中、高剂量(8.835、17.670、35.340 g/kg, 分别相当于临床剂量的 0.5、1、2 倍)组, 每组 9 只。各给药组 ig 相应药物(20 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 14 d。给药 30 min 后, 除对照组外, 其余小鼠继续进行慢性束缚应激处理。

2.3 行为学检测

2.3.1 糖水偏好实验 分别在给药前及给药第 7、14 天后进行糖水偏好实验。每只小鼠置于配有 2 个相同水瓶的笼中单独饲养, 2 个瓶子分别装有 1% 蔗糖水和饮用水。第 1 天在适应 24 h 后, 互换 1% 蔗糖水和饮用水的水瓶位置, 第 2 天继续适应 24 h。第 3 天对所有小鼠进行断水禁食处理 24 h, 结束后进行 2 h 的糖水偏好实验。糖水偏好实验前分别称定 1% 糖水和自来水瓶质量, 2 h 后取下 2 个瓶子, 再次称定质量, 计算糖水偏好率。

糖水偏好率 = 糖水饮用量 / (自来水饮用量 + 糖水饮用量)

2.3.2 悬尾实验 分别在给药第 7、14 天后进行悬尾实验。将小鼠倒挂在头部距离地面 20 cm 高度的装置上, 视频记录小鼠 6 min 内的悬尾状态, 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, 用秒表计算后 4 min 内的累计不动时间。

2.3.3 强迫游泳实验 分别在给药第 7、14 天后进

行强迫游泳实验。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 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ ，视频记录小鼠在 6 min 的游泳状态，当小鼠在容器中没有明显的游泳动作时被认为漂浮不动，用秒表计算后 4 min 时间段内的累计不动时间。

2.4 全脑及结肠病理观察和海马 Iba-1 表达检测

2.4.1 海马、皮层及结肠苏木素-伊红 (HE) 染色 小鼠断颈处死，冰上剥离，取固定 24 h 以上的全脑组织及结肠组织样本，制作石蜡切片，片厚 $4\ \mu\text{m}$ 。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海马 CA1 区、皮层及结肠组织病理变化。

2.4.2 免疫荧光染色检测海马 Iba-1 表达 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，滴加 Iba-1 抗体 ($1:4000$)， 4°C 孵育过夜，滴加二抗。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 血清及前额叶皮质生化指标的检测

小鼠眼眶取血，室温静置 30 min 后， $3500\ \text{r/min}$ 离心 15 min，取上清。按照试剂盒说明书检测小鼠血清中 SOD 活性和 MDA、ACTH、CORT、CRH、5-HT 水平，检测小鼠前额叶皮质 SOD 活性和 5-HT、BDNF、MDA 水平。

2.6 高通量测序技术测定肠道菌群结构

收集各组小鼠结肠内容物，置于灭菌的 EP 管中， -80°C 冻存。先对微生物组进行总 DNA 提取，再对目标片段进行 PCR 扩增，扩增产物磁珠纯化回收，将 PCR 扩增回收产物进行荧光定量，根据荧光

定量结果，按照每个样本的测序量需求，对各样本按相应比例进行混合，采用 Illumina 公司的 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 制备测序文库。上机进行高通量测序，结束后进行筛查分析。

2.7 Western blotting 检测前额叶皮层组织 ERK1/2、p-ERK1/2、CREB、p-CREB、BDNF 蛋白表达

取小鼠前额叶皮层，加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液，充分研磨， 4°C 离心取上清液，采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。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，于 5% 脱脂牛奶中封闭，分别加入 ERK1/2 ($1:1000$)、p-ERK1/2 ($1:3000$)、CREB ($1:1000$)、p-CREB ($1:1000$)、BDNF ($1:800$)、GAPDH ($1:25000$) 抗体， 4°C 过夜；TBST 洗膜 3 次，加入二抗室温孵育；TBST 洗膜 3 次，滴加 ECL 化学发光液显影，利用 Image J 软件计算目的蛋白的相对表达量。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 26.0 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 滋水清肝饮对抑郁小鼠行为学的影响

3.1.1 滋水清肝饮对抑郁小鼠糖水偏好率的影响 如表 1 所示，与对照组比较，给药前模型组及各给药组糖水偏好率显著下降 ($P < 0.01$)。给药 7 d 后，与模型组比较，盐酸氟西汀组及滋水清肝饮中剂量组糖水偏好率显著上升 ($P < 0.05$ 、 0.01)。给药 14 d 后，各给药组糖水偏好率均显著升高 ($P < 0.01$)。

3.1.2 滋水清肝饮对抑郁小鼠悬尾实验和强迫游泳实验不动时间的影响 如表 2 所示，与对照组比较，

表 1 滋水清肝饮对抑郁小鼠糖水偏好率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 1 Effect of Zishui Qinggan Yin on sucrose preference rate of depressed mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	糖水偏好率/%		
		给药前	给药 7 d	给药 14 d
对照	—	90.01 ± 2.16	91.97 ± 3.25	89.55 ± 4.74
模型	—	52.76 ± 10.83 ^{##}	51.88 ± 3.45 ^{##}	46.36 ± 7.80 ^{##}
盐酸氟西汀	0.01	55.06 ± 13.86 ^{##}	72.74 ± 5.30 [*]	84.36 ± 9.01 ^{**}
滋水清肝饮	8.835	54.76 ± 9.56 ^{##}	67.53 ± 12.94	79.90 ± 7.67 ^{**}
	17.670	56.02 ± 8.73 ^{##}	77.30 ± 11.17 ^{**}	84.53 ± 5.25 ^{**}
	35.340	55.40 ± 12.41 ^{##}	69.59 ± 15.04	80.96 ± 8.27 ^{**}

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

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

表 2 滋水清肝饮对抑郁小鼠悬尾实验和强迫游泳实验不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Effect of Zishui Qinggan Yin on immobility time in tail suspension test and forced swimming test of depressed mice ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	悬尾不动时间/s		强迫游泳不动时间/s	
		给药 7 d	给药 14 d	给药 7 d	给药 14 d
对照	—	88.32±13.22	90.19±23.18	86.11±12.59	80.37±11.62
模型	—	150.15±15.17 ^{##}	154.35±8.50 ^{##}	146.39±14.36 ^{##}	150.42±16.57 ^{##}
盐酸氟西汀	0.01	101.01±8.33 [*]	97.07±14.23 ^{**}	101.92±8.65 ^{**}	87.59±15.98 ^{**}
滋水清肝饮	8.835	125.46±9.48 [*]	116.94±15.13 [*]	126.77±15.00	120.01±14.57 ^{**}
	17.670	108.46±9.48 [*]	100.94±16.13 ^{**}	102.06±20.13 ^{**}	90.65±16.36 ^{**}
	35.340	120.3±20.95 [*]	115.54±25.95 [*]	133.23±18.28	118.95±10.78 ^{**}

模型组小鼠悬尾实验和强迫游泳实验不动时间明显增加 ($P < 0.01$)。给药 7、14 d 后,与模型组比较,各给药组小鼠悬尾实验不动时间明显缩短 ($P < 0.05$ 、 0.01)。给药 7 d 后,盐酸氟西汀组及滋水清肝饮中剂量组小鼠强迫游泳不动时间均缩短 ($P < 0.01$); 给药 14 d 后,各给药组小鼠强迫游泳不动时间均明显缩短 ($P < 0.01$)。

3.2 滋水清肝饮对抑郁小鼠全脑及结肠病理变化的影响

3.2.1 滋水清肝饮对抑郁小鼠海马 CA1 区、皮层组织及结肠组织病理变化的影响 如图 1 所示,对照组小鼠海马 CA1 区及皮层组织中神经细胞轮廓清晰,形态饱满。与对照组比较,模型组细胞变形,轮廓模糊且颜色被深染,结构形态较差,细胞核出现固缩。与模型组比较,滋水清肝饮低剂量组部分神经细胞形态结构发生改变,存在核固缩现象,其余各给药组细胞神经细胞的形态基本正常,核固缩现象减少。对照组小鼠结肠黏膜上皮完整,排列规则,肠隐窝结构正常,呈单管状。与正常组相比,模型组小鼠结肠排列松散严重,杯状细胞缺失肠隐窝萎缩且表面不规则,腺体受损严重。与模型组比较,各给药组小鼠结肠组织损伤均减轻。

3.2.2 滋水清肝饮对抑郁小鼠海马 CA1 区 Iba-1 表达的影响 如图 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠海马组织中出现大量小胶质细胞增生,突起回缩,胞体增大;与模型组比较,各给药组小胶质细胞标志物 Iba-1 表达明显减少。

3.3 滋水清肝饮对抑郁小鼠血清中 SOD 活性和 5-HT、CORT、ACTH、CRH、MDA 水平的影响

如表 3 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 5-HT 水平和 SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$),CORT、ACTH、CRH、MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 ACTH 和 MDA 水

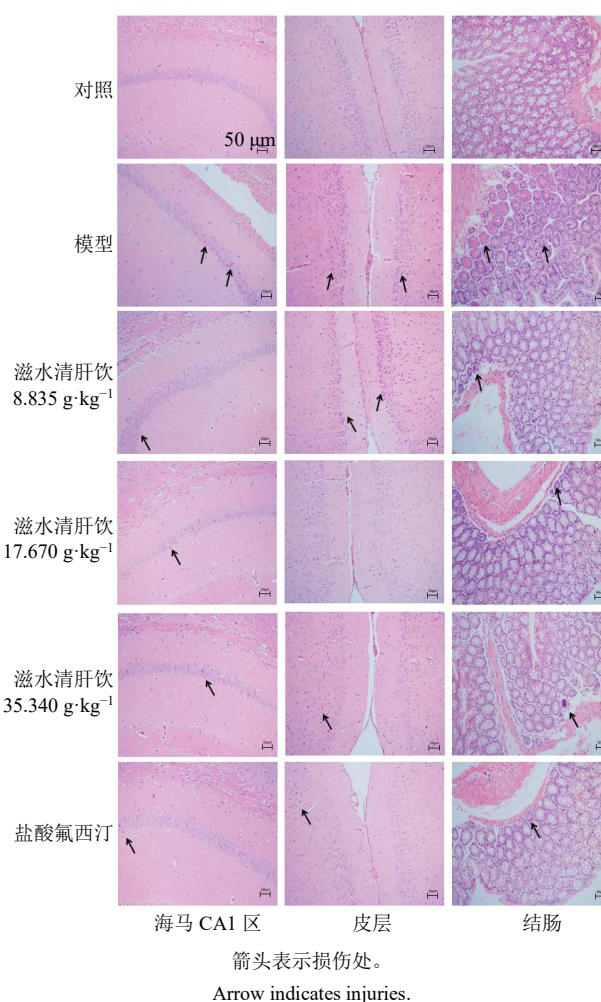


图 1 滋水清肝饮对抑郁小鼠海马 CA1 区、皮层组织及结肠组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Zishui Qinggan Yin on pathological changes in hippocampal CA1 region, cortical tissue and colon tissue of depressed mice (HE, ×200)

平显著降低 ($P < 0.01$), SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 盐酸氟西汀组和滋水清肝饮中剂量组 5-HT 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), CORT 和 CRH 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

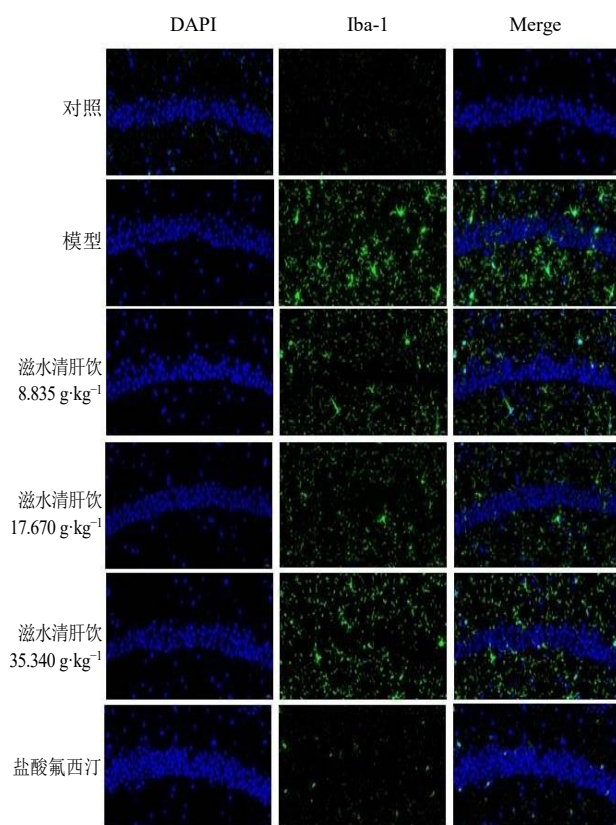


图 2 滋水清肝饮对抑郁小鼠海马 CA1 区 Iba-1 表达的影响 (×400)

Fig. 2 Effect of Zishui Qinggan Yin on Iba-1 expression in hippocampal CA1 region of depressed mice (× 400)

表 3 滋水清肝饮对抑郁小鼠血清中 SOD 活性和 5-HT、CORT、ACTH、CRH、MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 Effect of Zishui Qinggan Yin on SOD activity and 5-HT, CORT, ACTH, CRT, SOD, MDA levels in serum of depressed mice ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	5-HT/ (ng·mL ⁻¹)	CORT/ (ng·mL ⁻¹)	ACTH/ (pg·mL ⁻¹)	CRH/ (pg·mL ⁻¹)	SOD/ (U·mL ⁻¹)	MDA/ (nmol·mL ⁻¹)
对照	—	193.49±6.42	192.96±2.58	61.50±3.89	78.25±0.77	120.09±3.39	5.27±0.44
模型	—	176.26±2.52 ^{##}	221.16±13.87 ^{##}	76.86±2.54 ^{##}	97.24±3.42 ^{##}	79.14±10.64 ^{##}	8.26±1.51 ^{##}
盐酸氟西汀	0.01	191.73±6.84 ^{**}	192.23±5.15 [*]	63.86±2.62 ^{**}	80.73±3.66 ^{**}	122.15±9.88 ^{**}	5.48±0.48 ^{**}
滋水清肝饮	8.835	177.15±5.58	196.28±3.56	68.30±2.39 ^{**}	88.57±10.15	100.22±9.50 ^{**}	6.83±0.60 ^{**}
	17.670	186.12±3.13 [*]	192.18±2.14 [*]	63.93±2.17 ^{**}	80.84±5.36 ^{**}	111.33±5.64 ^{**}	5.86±0.47 ^{**}
	35.340	180.42±10.76	204.62±4.07	66.17±0.71 ^{**}	87.90±6.68	90.34±15.19 [*]	6.96±0.55 ^{**}

表 4 滋水清肝饮对抑郁小鼠前额叶皮层 SOD 活性和 5-HT、BDNF、MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Zishui Qinggan Yin on SOD activity and 5-HT, BDNF, MDA levels in prefrontal cortex of depressed mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	5-HT/(ng·mL ⁻¹)	BDNF/(pg·mL ⁻¹)	SOD/(U·mgprot ⁻¹)	MDA/(nmol·mgprot ⁻¹)
对照	—	304.84±12.91	824.38±32.34	222.24±19.19	8.42±1.93
模型	—	245.99±11.10 ^{##}	741.61±7.56 ^{##}	183.40±11.82 ^{##}	15.43±3.85 ^{##}
盐酸氟西汀	0.01	289.42±7.72 ^{**}	815.46±25.91 ^{**}	260.84±27.01 ^{**}	7.72±3.28 ^{**}
滋水清肝饮	8.835	262.66±9.93 [*]	796.21±21.32 [*]	213.22±26.83 ^{**}	11.71±1.90
	17.670	286.13±9.14 ^{**}	814.60±19.12 ^{**}	235.83±13.97 ^{**}	7.30±1.51 ^{**}
	35.340	277.87±6.52 ^{**}	804.83±22.72 ^{**}	233.69±14.85 [*]	9.91±2.66 ^{**}

3.4 滋水清肝饮对抑郁小鼠前额叶皮层 SOD 活性和 5-HT、BDNF、MDA 水平的影响

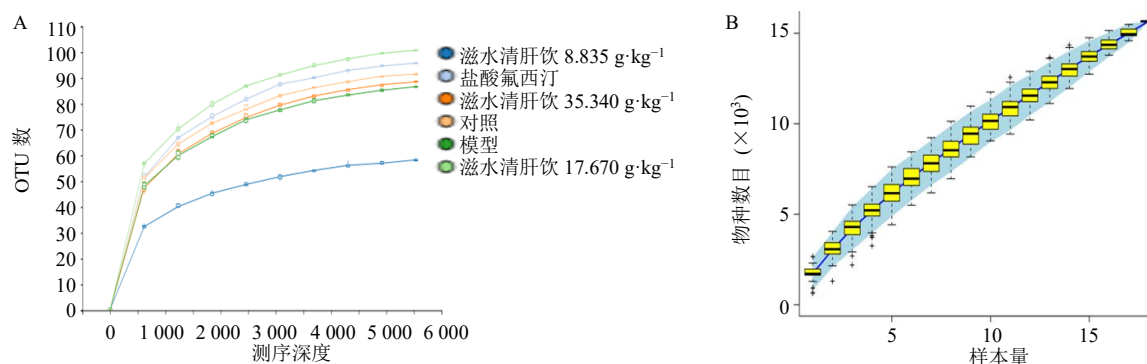
如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠前额叶皮层中 5-HT、BDNF 水平和 SOD 活性均显著降低 ($P<0.01$), MDA 水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠前额叶皮层中 5-HT、BDNF 水平和 SOD 活性均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 盐酸氟西汀组和滋水清肝饮中、高剂量组 MDA 水平显著升高 ($P<0.01$)。

3.5 滋水清肝饮对抑郁小鼠肠道菌群的影响

3.5.1 菌群测序结果质量分析 各组小鼠结肠内容物样品的稀释曲线见图 3-A, 送测数量合理, 测序深度足以满足后续研究。物种累积曲线见图 3-B, 在样本量渐增的同时, 所对应的物种数目也在增加, 且曲线渐趋平坦, 说明小鼠测序样品的数量合理。

3.5.2 各组分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 组成相似性 如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组独有的物种数量降低; 与模型组比较, 滋水清肝饮中剂量组及盐酸氟西汀组独有的物种数量均升高, 滋水清肝饮高、低剂量组均降低。

3.5.3 α 多样性分析 如表 5 所示, 与对照组比较, 模型组 Chao1 指数及 Observed species 指数均显著降低 ($P<0.05$), Simpson 指数及 Shannon 指数无显著差异; 与模型组比较, 滋水清肝饮中剂量组和



A-各组小鼠结肠内容物样品的稀释曲线；B-各组小鼠肠道菌群物种累积曲线图。

A-dilution curve of cecal contents samples in each group; B-species accumulation curve of intestinal flora of mice in each group.

图 3 小鼠肠道菌群测序结果质量分析

Fig. 3 Quality analysis of sequencing results of intestinal flora in mice

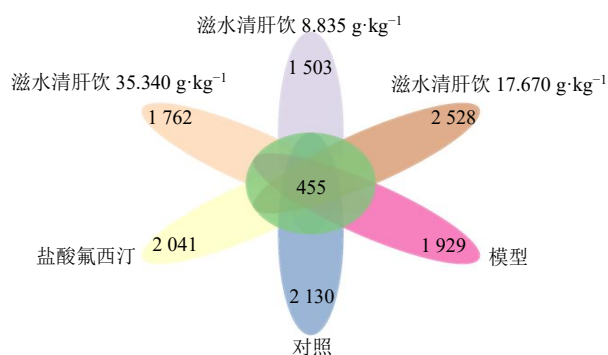


图 4 各组样本 ASV/OTU 的花瓣图

Fig. 4 Petals of ASV/OTU in each group

表 5 滋水清肝饮对抑郁小鼠肠道菌群多样性指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Zishui Qinggan Yin on intestinal flora diversity index of depressed mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Chao1 指数	Simpson 指数	Shannon 指数	Observed species 指数
对照	—	2 054.24 ± 123.07	0.95 ± 0.01	6.38 ± 0.31	1 868.20 ± 157.49
模型	—	1 830.36 ± 28.77 [#]	0.96 ± 0.01	6.04 ± 0.96	1 661.90 ± 7.18 [#]
盐酸氟西汀	0.01	1 966.69 ± 96.32 [*]	0.95 ± 0.01	6.31 ± 0.51	1 802.80 ± 37.91 [*]
滋水清肝饮	8.835	1 853.90 ± 124.23	0.95 ± 0.03	6.16 ± 0.06	1 614.13 ± 157.85
	17.670	2 149.69 ± 51.95 [*]	0.95 ± 0.02	6.71 ± 0.14	1 968.70 ± 193.96 [*]
	35.340	1 944.33 ± 179.49 [*]	0.95 ± 0.01	6.42 ± 0.52	1 752.07 ± 118.27

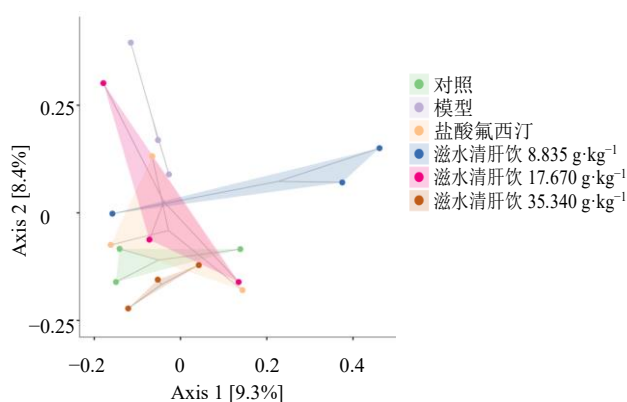


图 5 β 多样性分析

Fig. 5 β Diversity analysis

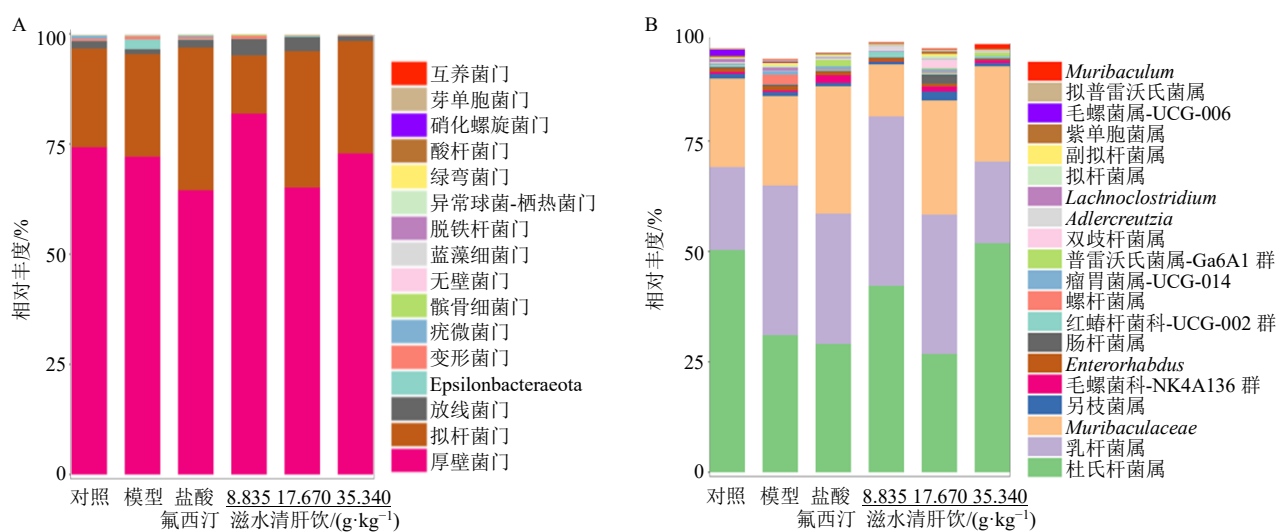
盐酸氟西汀组 Chao1 指数及 Observed species 指数均显著升高 ($P < 0.05$), Shannon 指数有升高趋势但无显著差异。

3.5.4 β 多样性分析 如图 5 所示, 主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 表明对照组及各给药组大部分样本有交叉, 模型组则单独于在 1 个位置, 说明抑郁小鼠的肠道群落结构发生了改变, 经滋水清肝饮治疗后肠道群落结构得到改善。

3.5.5 小鼠肠道菌群门及属水平中前 20 的生物物种组成 对对照组、模型组及各给药组小鼠肠道菌

群在门水平上物种组成进行分析 (图 6-A), 结果表明各组小鼠肠道菌群中厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidota)、放线菌门 (Actinobacteria)、变形杆菌门 (Proteobacteria) 为优势菌群, 总比例大于 85%。与对照组比较, 模型组小鼠肠道内的有益菌拟杆菌门及放线菌门等相对丰度下降, 有害菌变形杆菌门相对丰度增加; 与模型组比较, 各给药组有害菌厚壁菌门及变形杆菌门相对丰度均降低, 除滋水清肝饮低剂量组外, 其余各给药组拟杆菌门及放线菌门等相对丰度均有所增加。

对对照组、模型组及各给药组小鼠肠道菌群在属水平上物种组成进行分析 (图 6-B), 属水平上优



A-滋水清肝饮对小鼠肠道菌群门水平的影响; B-滋水清肝饮对小鼠肠道菌群属水平的影响。
A-effect of Zishui Qinggan Yin on phyla level of intestinal flora in mice; B-effect of Zishui Qinggan Yin on genus level of intestinal microflora in mice.

图 6 小鼠肠道菌群门及属水平中前 20 的生物物种组成

Fig. 6 Composition of top 20 biological species at level of phyla and genus in intestinal flora of depressed mice

势菌属为杜氏杆菌属 *Dubosiella*、乳杆菌属 *Lactobacillus*、*Muribaculaceae*、幽门螺杆菌属 *Helicobacter*、毛螺菌属 *Lachnospiraceae* 等。与对照组比较,模型组幽门螺杆菌属丰度升高,除杜氏杆菌属降低且有显著差异外,*Muribaculaceae*、乳酸杆菌属丰度降低有差异但不显著;与模型组比较,各给药组幽门螺杆菌属丰度均降低,杜氏杆菌属、毛螺菌属、乳杆菌属及 *Muribaculaceae* 丰度升高,以滋水清肝饮中剂量组及盐酸氟西汀组最为显著。

3.6 Western blotting 检测小鼠皮层组织 ERK1/2、p-ERK1/2、CREB、p-CREB、BDNF 蛋白表达

如图 7 和表 6 所示,与对照组比较,模型组小鼠前额叶皮层中 p-ERK1/2、p-CREB、BDNF 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组前额叶皮层组织中 p-ERK1/2、p-CREB、BDNF 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。

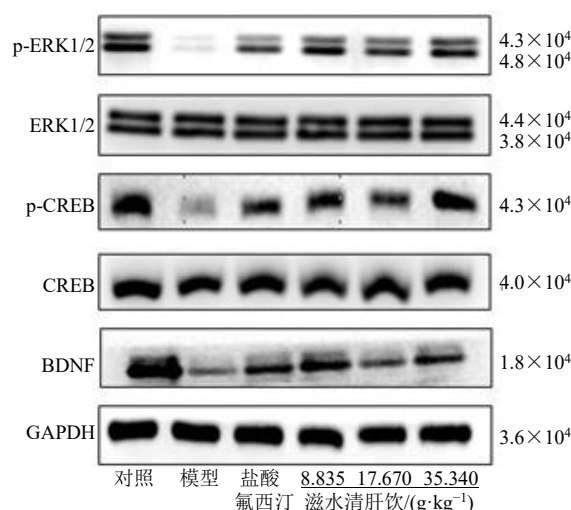


图 7 各组小鼠前额叶皮层中 ERK1/2、p-ERK1/2、CREB、p-CREB、BDNF 蛋白表达

Fig. 7 ERK1/2, p-ERK1/2, CREB, p-CREB and BDNF protein expressions in prefrontal cortex of mice in each group

表 6 滋水清肝饮对抑郁小鼠前额叶皮层组织 ERK1/2、p-ERK1/2、CREB、p-CREB、BDNF 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of Zishui Qinggan Yin on ERK1/2, p-ERK1/2, CREB, p-CREB and BDNF protein expressions in prefrontal cortex tissue of depressed mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	p-ERK1/2/ERK1/2	p-CREB/CREB	BDNF/GAPDH
对照	—	0.93±0.04	0.77±0.05	0.90±0.03
模型	—	0.11±0.01 ^{##}	0.36±0.08 ^{##}	0.31±0.04 ^{##}
盐酸氟西汀	0.01	0.93±0.02 ^{**}	0.85±0.02 ^{**}	0.54±0.06 [*]
滋水清肝饮	8.835	0.62±0.06 ^{**}	0.61±0.03 ^{**}	0.61±0.03 ^{**}
	17.670	0.94±0.01 ^{**}	0.70±0.07 ^{**}	0.83±0.05 ^{**}
	35.340	0.71±0.07 ^{**}	0.56±0.04 [*]	0.44±0.05 ^{**}

4 讨论

压力是抑郁症发展的致病因素之一^[16], 长期或慢性应激可导致 HPA 轴功能失调, 导致体内 CRH、ACTH、CORT 水平升高^[17]; 大脑氧化应激加重, 导致海马 CA1 区小胶质细胞过度激活释放大促炎细胞因子^[18]; 激活色氨酸-犬尿氨酸途径减少 5-HT 的生成; 肠道屏障通透性增加, 最终导致肠道生态失调^[19]。本研究通过 CRS 模型, 根据蔗糖摄入量减少、运动活动缺陷、绝望性行为来模拟临床抑郁症的发展和进展, 探究抑郁症的病理生理学特征, 围绕肠道菌群进行一系列探究分析, 探索阐述滋水清肝饮的抗抑郁作用与机制。

实验结果表明, 在 α 多样性分析结果中各组之间的物种丰富度和粪便菌群多样性有显著差异, 其中模型组的 Chao1、Observed species、Shannon 指数均有降低趋势。在 β 多样性分析中, 模型与其他群体之间存在明显差异, 表现出 CRS 后微生物群落结构的明显变化; 给予滋水清肝饮治疗后, 肠道菌落结构得到一定改善, 并与对照组有一定交集。在小鼠肠道菌群门和属水平中, 模型组有害菌厚壁菌门、变形杆菌门、幽门螺杆菌属等增加, 益生菌拟杆菌门、放线菌门、杜氏杆菌属、毛螺菌属、乳杆菌属、*Muribaculaceae* 等降低, 在 MDD 患者肠道菌群^[11]中也观察到了与之相似的结果。经滋水清肝饮及盐酸氟西汀治疗后, 各给药组益生菌丰度增加, 有害菌丰度降低, 其中以滋水清肝饮中剂量及盐酸氟西汀最为显著。在以上提及的有益菌门中, 杜氏杆菌属具有调节体内代谢、减轻炎症和提高肠道免疫力等功效的一类肠道菌属。*Muribaculaceae* 及毛螺菌属可产生短链脂肪酸, 促进肠道上皮的完整性^[20-22]。乳酸杆菌可通过迷走神经调节神经递质 5-HT 及多巴胺受体的表达来改善抑郁行为^[23], 进而改善小鼠抑郁样作用。由此表明, 滋水清肝饮可以通过调控抑郁小鼠肠道内菌群的组成进而改善小鼠抑郁症状。

与对照组比较, 模型组小鼠海马、皮层及结肠的病理损伤严重, 氧化应激加重, 5-HT 含量降低, 小鼠抑郁样行为加剧, 前额叶皮层中 5-HT 及 BDNF 含量降低。经过滋水清肝饮干预后, 小鼠全脑组织 HE 染色、全脑免疫荧光染色及结肠 HE 染色结果均表明其损伤程度远低于模型组。与模型组比较, 各给药组小鼠快感缺失情况减轻, 悬尾实验和强迫游泳实验不动时间缩短; 血清中 5-HT 含量增加, SOD 活力提高, CORT、ACTH、CRH 及 MDA 含量降

低; 前额叶皮层中 5-HT 及 BDNF 含量增加, SOD 活力提高, MDA 含量降低; 海马、皮层及结肠的病理状态得到改善, 海马小胶质细胞标志物 Iba-1 表达降低。表明滋水清肝饮可以提高小鼠体内神经递质 5-HT 及营养因子 BDNF 水平, 减轻氧化应激, 减轻炎症, 调节 HPA 轴, 从而发挥抗抑郁作用, 也表明滋水清肝饮给药不具有剂量相关性, 中剂量组即临床等效剂量组效果最好。

前额叶皮层是边缘皮层的一部分, 由于其丰富的神经相互连接, 涉及许多应激敏感的心理障碍。BDNF 是一种可塑性相关蛋白质, 源于大脑皮层的轴突末梢, 在啮齿动物和人类的大脑皮层中都高度表达, 并在神经元去极化时在轴突中释放^[24]。前额叶皮层中释放出的 BDNF 会结合受体酪氨酸激酶刺激 ERK, 而 ERK 作为细胞信号的递质, 参与细胞的迁移、分化、生长和存活。当 ERK 激活下游 CREB 后, 导致丝氨酸 133 (Ser133) 的磷酸化, 磷酸化的 CREB 具有神经保护作用, 可调节包括多巴胺能神经元在内的多个细胞基因转录的功能^[25]。p-CREB 又作为 BDNF 的上游调控 BDNF 的转录, 从而达到抗抑郁的效果。也有研究表明, BDNF 可以加速肠道排空并增加排便频率^[26], 增强肠平滑肌的肌电活性及增大收缩幅度的峰值, 增强孤立大鼠结肠的蠕动反射^[27]。实验结果表明, 与对照组比较, 模型组小鼠海马 BDNF、p-CREB、p-ERK1/2 蛋白表达均降低; 与模型组比较, 当给予不同剂量的滋水清肝饮后小鼠海马 BDNF、p-CREB、p-ERK1/2 蛋白表达均有不同程度的增加, 其中中剂量组即临床等效剂量组蛋白增加最为显著, 效果最好。

由于滋水清肝饮具有多成分、多靶点的作用, 实验中对于抗炎、抗氧化等作用仅体现在血液及皮层中的改变, 对其调控作用机制及其他损伤部位仍需深入研究。同时滋水清肝饮在重塑肠道菌群和调控小鼠皮层 ERK/CREB/BDNF 信号通路中发挥抗抑郁作用, 可作为抑郁症治疗的潜在新策略值得进一步的研究探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Arias-de la Torre J, Vilagut G, Ronaldson A, et al. Prevalence and variability of current depressive disorder in 27 European countries: A population-based study [J]. *Lancet Public Health*, 2021, 6(10): e729-e738.
- [2] Hasin D S, Sarvet A L, Meyers J L, et al. Epidemiology of

- adult DSM-5 major depressive disorder and its specifiers in the United States [J]. *JAMA Psychiatry*, 2018, 75(4): 336-346.
- [3] Das-Munshi J, Chang C K, Dregan A, *et al.* How do ethnicity and deprivation impact on life expectancy at birth in people with serious mental illness? Observational study in the UK [J]. *Psychol Med*, 2021, 51(15): 2581-2589.
- [4] 曹珊珊, 石勇, 张瑞华, 等. 抗抑郁柴胡方剂及柴胡皂苷类研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(9): 197-202.
- [5] Greenberg P E, Fournier A A, Sisitsky T, *et al.* The economic burden of adults with major depressive disorder in the United States (2010 and 2018) [J]. *Pharmacoeconomics*, 2021, 39(6): 653-665.
- [6] Malhi G S, Mann J J. Depression [J]. *Lancet*, 2018, 392(10161): 2299-2312.
- [7] 赵青竹, 刘雁峰, 石玥, 等. 滋水清肝饮临床应用进展 [J]. 中国生育健康杂志, 2018, 29(1): 98-100.
- [8] 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.
- [9] 张宇律, 郑和昕, 金李君. 滋水清肝饮加减联合前列地尔对肝肾阴虚型糖尿病周围神经病变患者外周血 GSH、NF- κ B 及肝肾功能的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(3): 696-699.
- [10] 王家艳, 林晓伟, 许玉皎. 滋水清肝饮加减联合氟哌噻吨美利曲辛对肾虚肝郁证老年脑梗死抑郁症患者的疗效及炎症因子和 HPA 轴的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(15): 3255-3258.
- [11] Jiang H Y, Ling Z X, Zhang Y H, *et al.* Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 48: 186-194.
- [12] Pariante C M, Lightman S L. The HPA axis in major depression: Classical theories and new developments [J]. *Trends Neurosci*, 2008, 31(9): 464-468.
- [13] Xiao Q F, Shu R N, Wu C L, *et al.* Crocin-I alleviates the depression-like behaviors probably via modulating “microbiota-gut-brain” axis in mice exposed to chronic restraint stress [J]. *J Affect Disord*, 2020, 276: 476-486.
- [14] Zhu Y Y, He J R, Wu C W, *et al.* Transcranial ultrasound stimulation relieves depression in mice with chronic restraint stress [J]. *J Neural Eng*, 2023, 20(3): 036011.
- [15] 孙楠楠, 沙龙泽, 许琪. C57BL/6J 小鼠慢性束缚应激抑郁模型的建立 [J]. 中国医学科学院学报, 2015, 37(1): 8-11.
- [16] Liu X X, Hou Z X, Han M M, *et al.* Salvianolic acid B alleviates comorbid pain in depression induced by chronic restraint stress through inhibiting GABAergic neuron excitation via an ERK-CREB-BDNF axis-dependent mechanism [J]. *J Psychiatr Res*, 2022, 151: 205-216.
- [17] Codeluppi S, Chatterjee D, Prevot T, *et al.* Chronic stress alters astrocyte morphology in mouse prefrontal cortex [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2021, 24: 842-853.
- [18] Huo R, Zeng B H, Zeng L, *et al.* Microbiota modulate anxiety-like behavior and endocrine abnormalities in hypothalamic-pituitary-adrenal axis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 489.
- [19] Li B J, Yang W, Ge T T, *et al.* Stress induced microglial activation contributes to depression [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 179: 106145.
- [20] Anand N, Gorantla V R, Chidambaram S B. The role of gut dysbiosis in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders [J]. *Cells*, 2022, 12(1): 54.
- [21] Trzeciak P, Herbert M. Role of the intestinal microbiome, intestinal barrier and psychobiotics in depression [J]. *Nutrients*, 2021, 13(3): 927.
- [22] Bravo J A, Forsythe P, Chew M V, *et al.* Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(38): 16050-16055.
- [23] Ehinger Y, Soneja D, Phamluong K, *et al.* Identification of novel BDNF-specific corticostriatal circuitries [J]. *eNeuro*, 2023, doi: 10.1523/ENEURO.0238-21.2023.
- [24] Zhen W Z, Zhen H J, Wang Y Y, *et al.* Mechanism of ERK/CREB pathway in pain and analgesia [J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1156674.
- [25] Coulie B, Szarka L A, Camilleri M, *et al.* Recombinant human neurotrophic factors accelerate colonic transit and relieve constipation in humans [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(1): 41-50.
- [26] Chai N L, Dong L, Li Z F, *et al.* Effects of neurotrophins on gastrointestinal myoelectric activities of rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(8): 1874-1877.
- [27] Grider J R, Piland B E, Gulick M A, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor augments peristalsis by augmenting 5-HT and calcitonin gene-related peptide release [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(3): 771-780.

[责任编辑 李亚楠]