

基于 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路研究逍遥散拆方药队挥发油部位对脂多糖致抑郁样模型小鼠的作用及机制

谢志强^{1,2}, 胡靖文^{1,2}, 曾九僧^{1,2}, 陈力^{2,3}, 谢红潇^{1,2}, 方洋^{1,2}, 曾南^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 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

3. 成都医学院第一附属医院 药剂科, 四川 成都 610500

摘要: 目的 采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小鼠抑郁样模型, 探究逍遥散拆方药队 (柴胡、当归、薄荷, CDB) 挥发油部位的抗抑郁作用, 及对磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 (protein kinase B, Akt)/核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路的影响。方法 雄性 C57BL/6J 小鼠按体质量分层随机分为对照组、模型组、盐酸氟西汀 (10 mg/kg) 组和 CDB 挥发油高、低剂量 (73.6、36.8 mg/kg) 组。小鼠连续 ig 给药 16 d, 给药第 13~15 天, ip 1 mg/kg LPS (20 mL/kg) 建立模型。通过糖水偏好测试、强迫游泳实验和悬尾实验观察动物抑郁样行为; ELISA 法检测小鼠血清白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平; 化学法检测小鼠海马组织丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 尼氏染色法检测小鼠海马尼氏小体数量; 免疫荧光法检测小鼠海马 CA3 区离子钙结合衔接分子-1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1, Iba-1) 表达; Western blotting 检测小鼠海马源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Nrf2、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、SOD1、p-p65/p65、IL-1 β 、Iba-1 蛋白表达。结果 CDB 挥发油显著提高模型小鼠糖水偏好率 ($P < 0.01$), 缩短强迫游泳和悬尾实验不动时间 ($P < 0.05, 0.01$); 显著降低海马 MDA 水平 ($P < 0.05$), 提高 GSH 水平及 SOD 活性 ($P < 0.05$), 降低血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平 ($P < 0.01$); 显著增加小鼠海马 CA3 区尼氏小体平均荧光强度并抑制 CA3 区 Iba-1 表达 ($P < 0.05, 0.01$); 显著上调海马组织 BDNF、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Nrf2、HO-1 和 SOD1 表达水平 ($P < 0.05, 0.01$), 抑制 p-p65/p65、IL-1 β 、Iba-1 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 CDB 挥发油能激活 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路, 提高抗氧化水平并减轻神经炎症, 从而发挥抗抑郁作用。

关键词: 逍遥散; 挥发油; 抑郁症; 氧化应激; 神经炎症; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶/核因子 E2 相关因子 2 信号通路;

藁本内酯; 薄荷脑; 香芹酮; 丁烯基苯酚

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)07-2283-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.07.015

Effect and mechanism of volatile oil from disassembled prescription of Xiaoyao San on LPS-induced depressive-like model mice based on PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway

XIE Zhiqiang^{1,2}, HU Jingwen^{1,2}, ZENG Jiuse^{1,2}, CHEN Li^{2,3}, XIE Hongxiao^{1,2}, FANG Yang^{1,2}, ZENG Nan^{1,2}

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

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

3. Department of Pharmacy, Clinical Medical College and the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

收稿日期: 2023-10-24

基金项目: 成都中医药大学西南特色中药资源国家重点实验室开放基金项目 (2020XSGG002); 成都中医药大学杏林学者项目 (QJJ2022012)

作者简介: 谢志强 (1999—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药药效学与毒理学研究。Tel: 13558701880 E-mail: xiezhiqiang2408@163.com

*通信作者: 曾南 (1969—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药效学与毒理学研究。

Tel: 13198502352 E-mail: 19932015@cdutcm.edu.cn

Abstract: Objective Using lipopolysaccharide (LPS) to induce a depression-like model in mice to investigate the antidepressant effects of volatile oil parts of disassembled prescription [Chaihu (*Bupleuri Radix*), Danggui (*Angelicae Sinensis Radix*), Bohe (*Menthae Haplocalycis Herba*), CDB] of Xiaoyao San (逍遥散) and its effects on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/ protein kinase B (Akt)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway. **Methods** Male C57BL/6J mice were stratified by body weight and randomly divided into control group, model group, fluoxetine hydrochloride (10 mg/kg) group and CDB volatile oil high- and low-dose (73.6, 36.8 mg/kg) groups. Mice in each group were gavaged 16 consecutive days, and the model was established by intraperitoneal injection of 1 mg/kg LPS (20 mL/kg) on 13th to 15th day of administration. Depression-like behavior was observed by sucrose preference test, forced swimming test and tail suspension test. Levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were measured by ELISA; Levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) activity in hippocampus of mice were measured by chemically; The number of mouse hippocampal Nissl bodies was detected by Nissen staining; Immunofluorescence method was used to detect the expression of ionized calcium-binding adapter molecule-1 (Iba-1) in CA3 area of mouse hippocampus; Western blotting was used to detect brain-derived neurotrophic factor (BDNF), p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1), SOD1, p-p65/p65, IL-1 β and Iba-1 protein expressions in hippocampus. **Results** CDB volatile oil significantly increased the rate of sucrose preference in model mice ($P < 0.01$), shortened the immobility time of forced swimming and tail suspension test ($P < 0.05, 0.01$), significantly decreased the hippocampal MDA level ($P < 0.05$), increased GSH level and SOD activity ($P < 0.05$), decreased the levels of IL-1 β and TNF- α in serum ($P < 0.01$), significantly increased the average fluorescence intensity of Nissl bodies in hippocampal CA3 region of mice and inhibited the expression of Iba-1 in CA3 region ($P < 0.05, 0.01$), significantly increased BDNF, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, Nrf2, HO-1 and SOD1 expressions in hippocampus ($P < 0.05, 0.01$), inhibited p-p65/p65, IL-1 β and Iba-1 protein expressions ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** CDB volatile oil increases antioxidant level and reduces neuroinflammation by activating PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway, and thus exerting antidepressant effects.

Key words: Xiaoyao San; volatile oil; depression; oxidative stress; neuroinflammation; PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway; ligustilide; DL-menthol; carvone; *n*-butylidenephthalide

抑郁症作为一种精神疾病，因其较高的疾病负担受到广泛关注。抑郁症患者会出现睡眠减少、食欲不振、兴趣降低表现，甚至情绪、思维和认知过程出现异常，严重影响患者生活质量^[1]。抑郁症的病理机制研究认为，氧化应激与抑郁症关系密切，氧化应激是指机体内促氧化与抗氧化能力之间失衡，造成活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累，导致细胞损伤^[2]。大脑消耗氧气较其他器官更多，并富含可氧化脂质，其中 ROS 生成也会更多，当 ROS 和抗氧化剂之间失衡造成脑内氧化应激，可导致神经元 DNA 的损伤^[3-4]。氧化应激参与多种信号转导途径的调节，包括丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 等信号通路^[5]，还会激活炎症信号通路如核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)，导致促炎细胞因子的释放^[6-7]。此外，蛋白质氧化会导致过氧化氢还原蛋白 2 (peroxiredoxin 2, PRDX2) 增加致使肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 释放，诱导神经炎症的发生^[8]。神经炎症同样与抑郁症密切相关，小胶质细胞是大脑中独特的免疫细胞，可为神经细胞提供营养，维持神经细胞的平衡^[9]。小胶

质细胞激活后其 M1 型释放大量炎症因子引发神经炎症，并引起神经营养因子水平降低，破坏神经可塑性，诱导神经元损伤^[10-11]。

逍遥散记载于宋代《太平惠民和剂局方》，为疏肝解郁名方，课题组前期研究发现逍遥散的拆方药队柴胡、当归、薄荷 (CDB) 具有与全方相当的抗抑郁作用，其作用机制可能与影响 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 水平有关^[12-14]，进一步研究发现 CDB 挥发油部位能通过激活核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) / 血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 路径调节氧化应激改善嗅球摘除 (olfactory bulbectomy, OB) 模型大鼠抑郁样行为，被认为是 CDB 抗抑郁作用的药效物质基础之一^[15]。此外，已有报道 CDB 挥发油中的主要成分藜本内酯能改善慢性不可预知温和应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 模型诱导的大鼠抑郁样行为^[16]；*L*-薄荷酮也可有效抑制 CUMS 小鼠海马 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-

aspartate protease-1, Caspase-1) 蛋白表达, 从而抑制神经炎症来改善动物抑郁样行为^[17]; *L*-薄荷醇可增加强迫游泳实验 (forced swimming test, FST) 小鼠脑组织 5-HT、多巴胺 (dopamine, DA)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 水平^[18]。由此, 可认为 CDB 挥发油能通过减轻神经炎症反应干预抑郁样行为的发生, 故本研究通过建立脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导的小鼠抑郁样模型, 探究 CDB 挥发油能否通过 PI3K/蛋白激酶 (protein kinase B, Akt) /Nrf2 通路改善氧化应激从而干预神经炎症来发挥抗抑郁作用, 以期进一步丰富、完善 CDB 挥发油的抗抑郁作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 体质量 (20 ± 2) g, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 合格证 SCXK (京) 2019-0010。所有动物均饲养在成都中医药大学实验动物观察室, 许可证号 SYXK(川)2020-124, 温度 (23 ± 2) °C, 自由进食进水, 24 h 明暗交替饲养, 昼夜各 12 h (8:00~20:00)。动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 20200312)。

1.2 药材

柴胡 (批号 200801) 购自河北一仁药业有限公司, 当归 (批号 201022) 购自四川省中药饮片有限公司, 薄荷 (批号 190702) 购自四川利民中药饮片有限公司, 经成都中医药大学中药鉴定教研室严铸云教授分别鉴定为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 干燥根、唇形科植物薄荷 *Mentha canadensis* Linnaeus. 干燥地上部分, 均符合《中国药典》2020 年版规定。

1.3 药品与试剂

LPS (批号 0000135947) 购自美国 Sigma 公司; 盐酸氟西汀 (批号 9833A, 20 mg/粒, 国药准字号 J20170022) 购自 Patheon France 公司; 小鼠 TNF- α 试剂盒 (批号 22B139) 购自伊科赛生物科技 (太仓) 有限公司; 小鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 试剂盒 (批号 E77S8BSLTM) 购自 Elabscience 公司; 总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒 (批号 020821210429、020821210603、092721220627)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (批号

032821210405、050222220714)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 120720210429) 购自碧云天生物技术有限公司; 还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 测定试剂盒 (批号 20210602、20220719) 购自南京建成生物工程研究所; Nrf2、Akt、PI3K、p-p65 兔多克隆抗体 (批号分别为 TA0639、TU421951、TU410470、TA8229) 均购自 Abmart 公司; HO-1、p-Akt、p-PI3K、p65、BDNF、钙结合衔接分子-1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1, Iba-1) 兔多克隆抗体 (批号分别为 82206、4060、4228、8242、47808、17198) 均购自美国 CST 公司; IL-1 β 兔多克隆抗体 (批号 AF4006) 购自 Affinity 公司; β -actin 兔多克隆抗体 (批号 GB11001)、GAPDH 兔多克隆抗体 (批号 GB11002)、HRP 羊抗兔 IgG 二抗 (批号 GB23303)、HRP 羊抗鼠 IgG 二抗 (批号 GB23301) 均购自 Servicebio 公司; SOD1 小鼠单克隆抗体 (批号 sc-271014) 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.4 仪器

SYNS00000 型纯水仪 (Minipore 公司); JCS 型电子天平秤 (英衡电器有限公司); Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪、Revos 脱水机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 63024 型悬尾测试箱、63022 型强迫游泳筒、63036 型灯箱 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 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); Panoramic SCAN II 型病理切片扫描仪 (3DHISTECH Kft 公司); DS-U3 型成像系统 (日本尼康公司); ChemiDoc 免染型化学发光凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 CDB 挥发油的制备

柴胡、当归、薄荷按配比称取适量装入烧瓶中^[19], 加入 8 倍量的水后, 采用挥发油轻油提取器蒸馏 6 h, 提取过程中以锡箔纸遮住提取器刻度区避光, 收集上层挥发油, 无水硫酸钠除水, 得到黄色油状液体, 称定质量, 计算得率为 0.3%, 保存于棕色瓶中, 置 -20 °C 冰箱备用。经 GC-MS 测定, CDB 挥发油中藜本内酯、薄荷脑、香芹酮、丁烯基苯酞质量分数分别为 45.89%、8.03%、4.60%、4.52%^[15]。

2.2 分组、造模及给药

雄性 C57BL/6J 小鼠按体质量分层随机分为对

对照组、模型组、盐酸氟西汀 (10 mg/kg) 组和 CDB 挥发油高、低剂量 (73.6、36.8 mg/kg) 组, 挥发油剂量设置按前期大鼠实验剂量换算而得^[15]。CDB 挥发油用 3% 聚山梨酯 80 与生理盐水配制。小鼠适应性喂养 3 d 后开始 ig 给药 (20 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积 3% 聚山梨酯 80 与生理盐水, 连续给药 16 d。于给药第 13~15 天, 除对照组外其余各组小鼠每日 ip 1 mg/kg LPS (20 mL/kg) 造模。造模后进行行为学测试, 然后麻醉小鼠, 眼眶取血分离血清, 并在冰台上剖取小鼠全脑及海马组织。

2.3 行为学测试

2.3.1 糖水偏好测试 (sucrose preference test, SPT) 将小鼠单笼放置并禁食禁水 24 h, 准备 1% 糖水糖水瓶和纯净水瓶并称重定质量, 每个笼子上放置 1 个纯净水瓶和 1 个糖水糖水瓶, 2 h 交换 2 个水瓶的位置, 以小鼠 4 h 内糖水偏好率作为评价指标。

糖水偏好率 = 糖水消耗量 / 总液体消耗量

2.3.2 强迫游泳实验 (forced swimming test, FST) 实验前 24 h 进行强迫游泳训练, 保持水温 (24±2) °C。将小鼠放入透明圆筒内开始计时 6 min, 前 2 min 为小鼠适应时间, 记录后 4 min 小鼠累积不动时间。采用 SMART 3.0 软件进行数据采集。

2.3.3 悬尾实验 (tail suspension test, TST) 将小鼠尾部 3 分之 1 处固定在悬尾箱中, 倒置悬挂, 从悬挂开始计时 6 min, 前 2 min 为小鼠适应时间段, 记录小鼠后 4 min 内累计不动时间。以小鼠四肢悬空不动、放弃挣扎为标准。采用 SMART 3.0 软件进行数据采集。

2.4 小鼠血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6 水平检测

小鼠全血室温静置 1 h 后, 3 500 r/min 离心 15 min, 分离血清。根据 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清 IL-1 β 和 IL-6 水平。

2.5 小鼠海马氧化应激水平检测

小鼠取血后立即在冰台上剖取海马组织, 置 -80 °C 冰箱保存。称取 20 mg 海马组织加入相应试剂, 将海马组织研磨匀浆, 12 000×g 离心 15 min, 分离上清液。用 BCA 法对上清液进行蛋白浓度测定。根据试剂盒说明书检测组织上清液 SOD 活性及 MDA、GSH 水平。

2.6 免疫荧光检测小鼠海马 CA3 区小胶质细胞激活

将小鼠全脑于 4% 多聚甲醛中固定, 经包埋后切片。切片脱蜡至水后用柠檬酸缓冲液进行抗原修复, 冷却后 PBS 溶液 (pH 7.4) 洗涤。组化笔画圈

后加入自发荧光淬灭剂, 冲洗后血清封闭 30 min, 然后滴加 Iba-1 兔源抗体, 4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤后加入荧光二抗避光孵育 50 min, PBS 洗涤后滴加 DAPI 避光孵育 10 min, 再次用 PBS 洗涤加入抗荧光淬灭封片剂封片。将切片置于荧光显微镜下观察并采集图像, DAPI 染出的细胞核在紫外的激发下为蓝色, 阳性表达为红色。采用 Image J 软件进行分析, 对每张照片进行分析得出每张照片上阳性的累积荧光强度 (integrated optical density, IOD) 以及像素面积 (AREA), 并计算平均荧光强度 (average optical, AO)。

$$AO = IOD / AREA$$

2.7 尼氏染色检测小鼠海马 CA3 区神经元损伤

取小鼠全脑于 4% 多聚甲醛中固定, 经包埋、切片后脱蜡至水, 放入预热 50 °C 的 1% 甲苯胺蓝水溶液中染色 45 min, 水洗终止染色。显微镜下控制分化程度, 水洗后烤干, 二甲苯透明后加入中性树脂封片。对小鼠海马 CA3 区进行图像采集, 脑组织尼氏体呈深蓝色, 背景淡蓝色。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件选取相同的蓝色作为判断所有切片图像阳性的统一标准, 方法同“2.6”项, 计算 AO 值。

2.8 Western blotting 检测海马 BDNF、PI3K/Akt/Nrf2 以及 NF- κ B 通路相关蛋白表达

称取小鼠海马组织 20 mg, 加入 200 μ L RIPA 裂解液 (RIPA: 蛋白酶抑制剂: 磷酸酶抑制剂 = 98: 1: 1)。低温匀浆后冰上裂解 1 h, 12 000×g 离心 15 min, 取上清液, BCA 法测定蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液制备海马组织样本。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, 封闭后, 4 °C 孵育对应的一抗过夜, 第 2 天洗膜后孵育二抗, 洗膜后在凝胶成像系统中成像, 并通过 Image Lab 软件分析 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、Nrf2、HO-1、SOD1、BDNF、p-p65、p65、IL-1 β 、Iba-1 蛋白表达。

2.9 统计学分析

使用 SPSS 26.0 统计软件分析数据, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量数据符合正态分布使用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 非正态分布数据使用非参数检验分析。

3 结果

3.1 CDB 挥发油对 LPS 诱导的抑郁样小鼠行为学的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠糖水

表1 CDB挥发油对LPS诱导的小鼠抑郁样行为的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of CDB volatile oil on LPS-induced depressive-like behavior in mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	糖水偏好率/%	FST 不动时间/s	TST 不动时间/s
对照	—	84.14 ± 6.69	123.65 ± 31.75	92.89 ± 43.64
模型	—	53.36 ± 6.00 ^{###}	193.76 ± 33.06 ^{###}	162.45 ± 35.73 ^{###}
CDB 挥发油	36.8	70.42 ± 8.48 ^{**}	200.55 ± 30.24	123.30 ± 30.90 [*]
	73.6	72.30 ± 11.75 ^{**}	120.01 ± 17.97 ^{**}	114.89 ± 47.23 ^{**}
盐酸氟西汀	10	71.48 ± 8.32 ^{**}	191.55 ± 39.60	116.96 ± 47.75 ^{**}

与对照组比较: #*P*<0.05 ##*P*<0.01 ###*P*<0.001; 与模型组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001, 下表同。

#*P*<0.05 ##*P*<0.01 ###*P*<0.001 vs control group; **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001 vs model group, same as below tables.

偏好率明显降低 (*P*<0.001), FST、TST 的不动时间显著延长 (*P*<0.001), 表明 ip LPS 可导致小鼠快感缺失和奖赏机制缺乏, 绝望行为明显增加, 使动物出现抑郁样行为表现。与模型组比较, 各给药组小鼠糖水偏好率明显升高 (*P*<0.01), TST 不动时间显著缩短 (*P*<0.05、0.01), CDB 挥发油高剂量组 FST 不动时间显著缩短 (*P*<0.01), 表明 CDB 挥发油能改善动物抑郁样行为。

3.2 CDB 挥发油对 LPS 诱导的抑郁样小鼠血清炎症因子水平的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清 IL-1β 和 TNF-α 水平显著增加 (*P*<0.001)。与模型组比较, CDB 挥发油各剂量组小鼠血清中 IL-1β、TNF-α 水平显著降低 (*P*<0.01), 盐酸氟西汀组 TNF-α 水平显著降低 (*P*<0.01)。

表2 CDB挥发油对LPS诱导的抑郁样小鼠血清IL-1β和TNF-α水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of CDB volatile oil on IL-1β and TNF-α in serum of LPS-induced depressive-like mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	12.24 ± 2.50	29.48 ± 7.02
模型	—	32.48 ± 2.60 ^{###}	82.46 ± 18.68 ^{###}
CDB 挥发油	36.8	23.49 ± 3.78 ^{**}	48.08 ± 12.54 ^{**}
	73.6	20.67 ± 4.14 ^{**}	40.06 ± 6.60 ^{**}
盐酸氟西汀	10	29.92 ± 2.90	44.00 ± 11.99 ^{**}

3.3 CDB 挥发油对 LPS 诱导的抑郁样小鼠海马组织氧化应激水平的影响

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马 MDA 水平显著增加 (*P*<0.01), GSH 水平及 SOD 活性显著降低 (*P*<0.05、0.01), 提示 LPS 可诱导小鼠中枢呈现氧化应激表现。与模型组比较, CDB

表3 CDB挥发油对LPS诱导的抑郁样小鼠海马组织MDA、GSH水平及SOD活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of CDB volatile oil on MDA, GSH levels and SOD activity in hippocampus of LPS-induced depressive-like mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·g ⁻¹)	GSH/(μmol·g ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)
对照	—	9.44 ± 2.33	17.05 ± 4.16	13.45 ± 2.08
模型	—	13.39 ± 1.49 ^{##}	8.75 ± 1.87 [#]	9.14 ± 1.83 ^{##}
CDB 挥发油	36.8	10.56 ± 3.43	12.79 ± 5.88	10.57 ± 1.96
	73.6	9.98 ± 1.21 [*]	18.62 ± 2.71 [*]	12.06 ± 1.87 [*]
盐酸氟西汀	10	9.77 ± 1.25 [*]	17.68 ± 5.38 [*]	12.27 ± 1.39 [*]

挥发油高剂量组和盐酸氟西汀组 MDA 水平显著降低 (*P*<0.05), GSH 水平及 SOD 活性均显著升高 (*P*<0.05), 提示 CDB 挥发油能抑制 LPS 诱导的氧化应激反应。

3.4 CDB 挥发油对 LPS 诱导的抑郁样小鼠海马 CA3 区小胶质细胞激活标志物 Iba-1 表达的影响

如图 1 和表 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马 CA3 区 Iba-1 表达显著增加 (*P*<0.001), 提示 LPS 可刺激中枢小胶质细胞激活, 从而引起中枢神经炎症, 进而致使小鼠的行为学异常。与模型组

比较, CDB 挥发油高剂量组和盐酸氟西汀组小鼠海马 CA3 区 Iba-1 表达显著下调 (*P*<0.05、0.01), 表明 CDB 挥发油能有效抑制 LPS 诱导的神经炎症。

3.5 CDB 挥发油对 LPS 诱导的抑郁样小鼠海马 CA3 区尼氏小体的影响

如图 2 和表 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马 CA3 区尼氏小体 AO 值显著降低 (*P*<0.001), 提示模型组小鼠海马 CA3 区神经元有损伤。与模型组比较, 各给药组海马 CA3 区尼氏小体 AO 值均显著降低 (*P*<0.05、0.01), 表明 CDB 挥发油

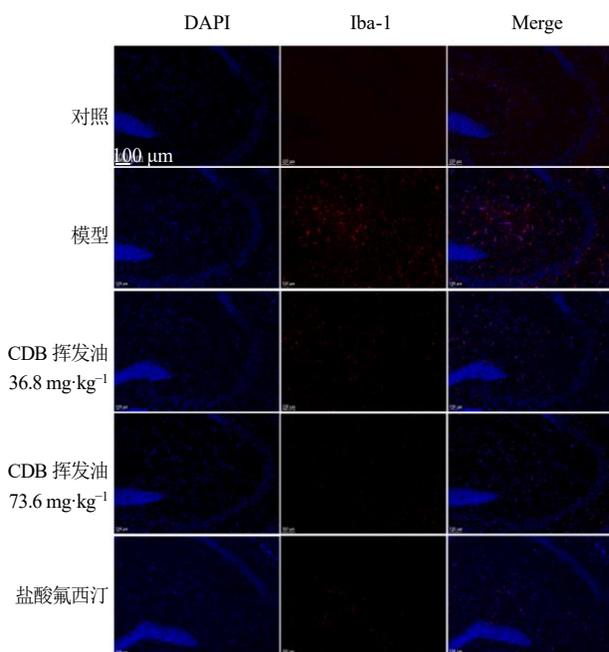


图 1 CDB 挥发油对 LPS 诱导的抑郁样小鼠海马 CA3 区 Iba-1 表达的影响 (×200)

Fig. 1 Effect of CDB volatile oil on Iba-1 expression in CA3 region of hippocampus of LPS-induced depressive-like mice (× 200)

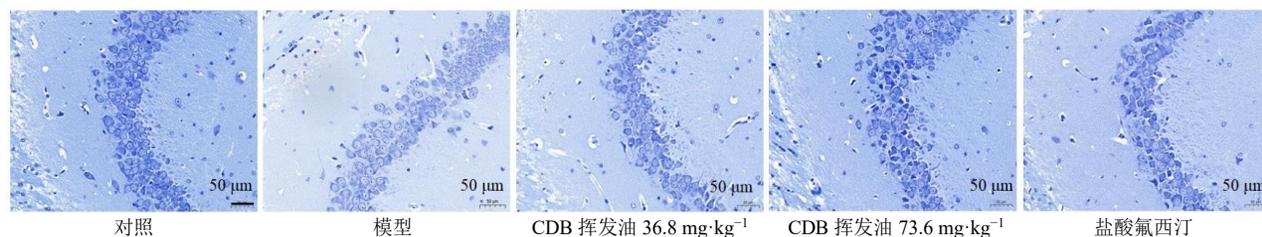


图 2 CDB 挥发油对 LPS 诱导的抑郁样小鼠海马 CA3 区尼氏小体的影响 (×400)

Fig. 2 Effect of CDB volatile oil on Nissl bodies in CA3 region of hippocampus of LPS-induced depressive-like mice (× 400)

表 5 CDB 挥发油对 LPS 诱导的抑郁样小鼠海马 CA3 区尼氏小体的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 5 Effect of CDB volatile oil on Nissl bodies in CA3 region of hippocampus of LPS-induced depressive-like mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	AO/%
对照	—	2.10 ± 0.35
模型	—	0.79 ± 0.13 ^{###}
CDB 挥发油	36.8	1.45 ± 0.48 [*]
	73.6	1.75 ± 0.35 ^{**}
盐酸氟西汀	10	1.42 ± 0.31 [*]

被抑制，与氧化应激反应有关。模型组小鼠海马 p-p65/p65 有升高趋势，IL-1β 和 Iba-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)，提示模型组小鼠出现神经炎

表 4 CDB 挥发油对 LPS 诱导的抑郁样小鼠海马 CA3 区 Iba-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 Effect of CDB volatile oil on Iba-1 expression in CA3 region of hippocampus of LPS-induced depressive-like mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Iba-1 表达
对照	—	7.15 ± 0.29
模型	—	35.22 ± 3.32 ^{###}
CDB 挥发油	36.8	22.40 ± 3.68
	73.6	11.28 ± 3.43 ^{**}
盐酸氟西汀	10	13.50 ± 4.08 [*]

能够有效改善神经元损伤。

3.6 CDB 挥发油对 LPS 诱导的抑郁样小鼠海马 BDNF、PI3K/Akt/Nrf2 与 NF-κB 通路相关蛋白表达的影响

如图 3 和表 6、7 所示，与对照组比较，模型组小鼠海马组织 BDNF 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)，提示 LPS 诱导的小鼠抑郁症模型成功^[20]。模型组小鼠海马组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Nrf2、HO-1 和 SOD1 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)，提示模型组小鼠 PI3K/Akt/Nrf2 通路

与模型组比较，CDB 挥发油高剂量组 BDNF 和 PI3K/Akt/Nrf2 通路相关蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$ 、0.01)，IL-1β 和 Iba-1 蛋白表达水平均显著下调 ($P < 0.05$ 、0.01)，提示 CDB 挥发油能通过调节 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路发挥抗氧化作用并抑制神经炎症，从而达到抗抑郁样行为目的。

4 讨论

逍遥散的拆方药队 CDB 是基于功能药队拆方研究模式获得的与逍遥散抗抑郁作用相当的精简方，方中柴胡疏肝解郁，调节气机；当归养血和肝，补其亏损；薄荷增强升发疏泄，疏肝理脾。前期研究已证实 CDB 对 CUMS 模型动物有良好的抗抑郁作用，作用机制与升高 5-HT、BDNF 水平及调节下

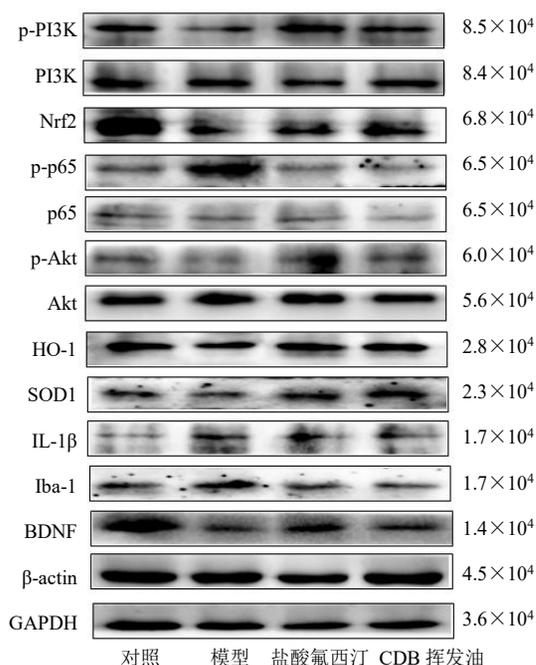


图 3 CDB 挥发油对 LPS 诱导的抑郁样小鼠海马 BDNF、PI3K/Akt/Nrf2 与 NF-κB 通路蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of CDB volatile oil on protein expressions of BDNF, PI3K/Akt/Nrf2 and NF-κB pathway in hippocampus of LPS-induced depressive-like mice

表 6 CDB 挥发油对 LPS 诱导的抑郁样小鼠海马 BDNF 以及 PI3K/Akt/Nrf2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Effect of CDB volatile oil on BDNF and PI3K/Akt/Nrf2 protein expressions in hippocampus of LPS-induced depressive-like mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量					
		BDNF/β-actin	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin	SOD1/GAPDH
对照	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	—	0.47 ± 0.11 ^{##}	0.72 ± 0.12 [#]	0.38 ± 0.11 ^{##}	0.41 ± 0.11 ^{###}	0.58 ± 0.14 ^{##}	0.73 ± 0.15 [#]
盐酸氟西汀	10	1.04 ± 0.28 ^{**}	1.18 ± 0.22 [*]	1.07 ± 0.24 ^{**}	1.11 ± 0.25 ^{**}	1.24 ± 0.32 [*]	1.58 ± 0.47 [*]
CDB 挥发油	73.6	1.06 ± 0.26 ^{**}	1.13 ± 0.20 [*]	1.13 ± 0.29 ^{**}	0.95 ± 0.25 ^{**}	1.20 ± 0.36 [*]	1.70 ± 0.54 [*]

表 7 CDB 挥发油对小鼠海马 NF-κB、Iba-1 以及 IL-β 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Effect of CDB volatile oil on NF-κB, Iba-1 and IL-β protein expressions in hippocampus of LPS-induced depressive-like mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量		
		p-p65/p65	IL-β/β-actin	Iba-1/GAPDH
对照	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	—	1.85 ± 0.61	1.63 ± 0.14 ^{##}	2.61 ± 0.56 ^{##}
盐酸氟西汀	10	1.36 ± 0.49	1.02 ± 0.26 ^{**}	1.47 ± 0.47 [*]
CDB 挥发油	73.6	1.19 ± 0.38	0.98 ± 0.32 ^{**}	1.44 ± 0.32 [*]

制炎症反应的关联。本研究主要采用 LPS 诱导的抑郁样小鼠模型，进一步探究 CDB 挥发油的抗抑郁作用及其干预 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路从而影响炎症反应的作用机制，为 CDB 挥发油的深入研究奠定一定基础。

丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 轴功能亢进有关^[12,21]。因方中柴胡、当归、薄荷 3 味药物的挥发油含量均较为丰富，而芳香疗法也被认为是缓解抑郁症的有效疗法，挥发油及其有效成分易于透过血脑屏障，能快速与中枢神经系统受体相互作用而改善患者的焦虑和抑郁状态^[22-23]。GC-MS 分析发现 CDB 挥发油主要成分包括藁本内酯、薄荷脑、异薄荷酮等，上述成分均有通过抑制小胶质细胞激活、抑制炎症因子的释放、抑制神经元凋亡等作用来发挥抗抑郁作用的报道^[16,24]，提示 CDB 挥发油可能是 CDB 抗抑郁作用发挥的主要有效部位之一。此外，课题组前期 OB 大鼠模型实验已表明 CDB 挥发油抗抑郁作用的发挥与激活 Nrf2/HO-1 路径调节氧化应激有关，氧化应激与神经炎症反应相关联，两者均被认为参与到抑郁症发生发展的病理过程中。OB 模型是通过手术摘除动物嗅球以模拟抑郁症患者嗅球萎缩，诱导动物出现激越性抑郁样行为，动物水平运动会显著增加^[25]；而 LPS 诱导的抑郁样行为对动物的自主活动影响不突出，但 2 种动物模型均会表现出氧化应激的发生，其中 LPS 模型相对更适合观察药物抗抑郁作用与抑

LPS 诱导的动物抑郁样模型已被广泛报道，ip LPS 可引起动物血脑屏障通透性改变，诱发动物神经炎症和氧化应激，致使动物出现抑郁样状态^[26-28]。本研究结果表明，ip LPS 所建立的小鼠抑郁样模型，小鼠出现糖水偏好率降低，FST 和 TST 的不动时间

明显延长,提示造模成功。此外,模型小鼠海马组织 MDA 水平升高,GSH 水平和 SOD 活性降低,呈现氧化应激状态;模型小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平升高,海马小胶质细胞被激活,呈现炎症反应;小鼠海马 CA3 区尼氏小体消失,出现边界模糊的形态,且神经元密度降低,神经元出现损伤。表明该模型呈现氧化应激表现及神经炎症反应,从而引起海马部位神经元损伤,由此与抑郁样行为的发生相关。研究发现,通过 CDB 挥发油的前处理,能明显对抗模型小鼠上述各项指标的异常,如降低海马 MDA 水平,提高 GSH 水平及 SOD 活性,抑制氧化应激;降低血清 TNF- α 、IL-1 β 水平,抑制海马小胶质细胞的激活,升高 CA3 区尼氏小体 AO 值,发挥神经保护作用。CDB 挥发油高、低剂量均能有效改善模型小鼠的抑郁样行为,调节 MDA、GSH、TNF- α 、IL-1 β 水平和 SOD 活性,并增加海马尼氏小体数量,抑制海马 Iba-1 表达。因此进一步的机制研究中,选用药效相对为优的 CDB 挥发油高剂量(73.6 mg/kg)组的样本开展其对 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路影响的工作。

Nrf2 是与氧化应激和神经炎症密切相关的蛋白,Nrf2 可识别 DNA 损伤并发挥修复和清除作用,且 Nrf2 能调节 BDNF 与 IL-10 发挥保护作用^[29-30]。BDNF 作为神经营养蛋白家族中调节学习、记忆和神经可塑性有关的蛋白,研究证实抑郁症患者海马和前额叶皮层 BDNF 表达明显降低^[20],可作为临床诊断抑郁症的辅助指标之一。氧化应激发生时会导致 Nrf2 受到抑制,并与 PI3K/Akt 信号通路抑制相关,而 PI3K/Akt-Nrf2 通路的抑制则使抗氧化作用减弱,又会诱导 NF- κ B 信号通路的激活^[31]。本研究发现,LPS 诱导的模型小鼠海马组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Nrf2、HO-1、SOD1 和 BDNF 的蛋白表达量明显降低。与模型组比较,CDB 挥发油组上述相关蛋白表达量明显上调,并且有降低 p-p65/p65 表达的趋势,显著抑制海马部位 Iba-1、IL-1 β 的表达,提示 CDB 挥发油可能通过激活 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路提高抗氧化作用,并抑制 NF- κ B 信号通路减轻神经炎症反应从而发挥抗抑郁作用。

此外,前期研究表明 CDB 挥发油在 46 mg/kg、23 mg/kg 剂量下灌胃给予 OB 模型大鼠有良好抗抑郁作用,本研究中依据大鼠有效剂量等效换算为小鼠给药剂量 73.6、36.8 mg/kg,相当于原生药量 24.5、12.3 g/kg。该剂量远低于前期研究所发现的 CDB 石

油醚部位(与挥发油成分基本一致)半数致死量(50% lethal dose, LD₅₀)的剂量,此剂量为临床日用剂量 1 554 倍,生药量为 851.4 g/kg^[32]。实验过程中对小鼠的一般观察也未见异常情况,可认为本研究中采用的 CDB 挥发油剂量安全性高。

综上,CDB 挥发油能改善 LPS 诱导的小鼠抑郁样行为,增加海马 CA3 区尼氏小体的合成,表现出神经保护作用,作用发挥与其调节 PI3K/Akt 信号通路激活 Nrf2/HO-1 信号通路,提高 GSH 水平及 SOD 活性,降低 MDA 水平发挥抗氧化作用有关;以及进一步影响 NF- κ B 信号通路,抑制海马小胶质细胞激活来抑制神经炎症反应有关。但本研究尚未使用相关抑制剂阻断关键蛋白表达后进行反向验证,后续实验可从此角度开展深入研究,以明确 CDB 挥发油对氧化应激和神经炎症影响的分子机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang Q, Zhao Y X, Qin X M, et al. Deciphering relationship between depression and microbial molecules based on multi-omics: A case study of Chaigui Granules [J]. *Chin Herb Med*, 2024, <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2023.12.003>
- [2] Vaváková M, Ďuračková Z, Trebatická J. Markers of oxidative stress and neuroprogression in depression disorder [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 898393.
- [3] Bhatt S, Nagappa A N, Patil C R. Role of oxidative stress in depression [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(7): 1270-1276.
- [4] 薛亚兰,许晶廷,邱继红.淫羊藿苷对抑郁症大鼠抑郁样行为和神经元损伤的影响[J].*临床和实验医学杂志*, 2021, 20(20): 2152-2156.
- [5] Jomova K, Raptova R, Alomar S Y, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging [J]. *Arch Toxicol*, 2023, 97(10): 2499-2574.
- [6] Czarny P, Wigner P, Galecki P, et al. The interplay between inflammation, oxidative stress, DNA damage, DNA repair and mitochondrial dysfunction in depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 80(Pt C): 309-321.
- [7] Reuter S, Gupta S C, Chaturvedi M M, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(11): 1603-1616.
- [8] Behl T, Rana T, Alotaibi G H, et al. Polyphenols inhibiting MAPK signalling pathway mediated oxidative stress and inflammation in depression [J]. *Biomed Pharmacother*,

- 2022, 146: 112545.
- [9] Wang H X, He Y, Sun Z L, *et al.* Microglia in depression: An overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 132.
- [10] Beurel E, Toups M, Nemeroff C B. The bidirectional relationship of depression and inflammation: Double trouble [J]. *Neuron*, 2020, 107(2): 234-256.
- [11] Guo X Y, Rao Y X, Mao R Z, *et al.* Common cellular and molecular mechanisms and interactions between microglial activation and aberrant neuroplasticity in depression [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 181: 108336.
- [12] 何敏, 武志强, 阙昌田, 等. 逍遥散拆方药队的抗抑郁作用及部分机制研究 [J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(6): 5-9.
- [13] 曾九僧, 陈力, 彭希, 等. 逍遥散拆方药队醋酸乙酯部位抗抑郁作用的 HPA 轴-神经可塑性关联调控机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(11): 3534-3547.
- [14] 渐衬, 李孟宇, 王雅泽, 吕梦, 等. 基于路径分析数学模型探讨逍遥散功效药队抗抑郁配伍关系 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(5): 871-877.
- [15] 胡靖文, 谢志强, 曾九僧, 等. 基于嗅球摘除模型大鼠柴当薄组方挥发油抗抑郁作用及 Nrf2/HO-1 机制 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(8): 1507-1514.
- [16] Ma J C, Zhang H L, Huang H P, *et al.* Antidepressant-like effects of Z-ligustilide on chronic unpredictable mild stress-induced depression in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1): 677.
- [17] Xue J S, Li H Y, Deng X Y, *et al.* L-Menthone confers antidepressant-like effects in an unpredictable chronic mild stress mouse model via NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines and central neurotransmitters [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, 134: 42-48.
- [18] Wang W D, Jiang Y Y, Cai E B, *et al.* L-Menthol exhibits antidepressant-like effects mediated by the modification of 5-HTergic, GABAergic and DAergic systems [J]. *Cogn Neurodyn*, 2019, 13(2): 191-200.
- [19] 何敏. 逍遥散拆方药队的抗抑郁作用及其 5-HT/BDNF 机制实验研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [20] Carniel B P, da Rocha N S. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and inflammatory markers: Perspectives for the management of depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 108: 110151.
- [21] 王学, 刘蓉, 罗杰, 等. 基于 CUMS 大鼠逍遥散拆方药队抗抑郁作用及 BDNF/HPA 机制研究 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(1): 14-19.
- [22] Zhang Y L, Long Y, Yu S, *et al.* Natural volatile oils derived from herbal medicines: A promising therapy way for treating depressive disorder [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 164: 105376.
- [23] Agatonovic-Kustrin S, Kustrin E, Gegechkori V, *et al.* Anxiolytic terpenoids and aromatherapy for anxiety and depression [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1260: 283-296.
- [24] 朱帅鸣, 骆芙瑶, 麻浩, 等. 薄荷脑的药理作用及开发应用现状 [J]. *中国药房*, 2023, 34(13): 1651-1655.
- [25] 罗杰, 刘小波, 吕红君, 等. 逍遥散对抑郁大鼠的行为学及抗氧化作用的影响 [J]. *中成药*, 2019, 41(12): 2869-2875.
- [26] Shen F M, Song Z J, Xie P, *et al.* *Polygonatum sibiricum* polysaccharide prevents depression-like behaviors by reducing oxidative stress, inflammation, and cellular and synaptic damage [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114164.
- [27] Fronza M G, Baldinotti R, Fetter J, *et al.* Beneficial effects of QTC-4-MeOBnE in an LPS-induced mouse model of depression and cognitive impairments: The role of blood-brain barrier permeability, NF- κ B signaling, and microglial activation [J]. *Brain Behav Immun*, 2022, 99: 177-191.
- [28] Arioiz B I, Tastan B, Tarakcioglu E, *et al.* Melatonin attenuates LPS-induced acute depressive-like behaviors and microglial NLRP3 inflammasome activation through the SIRT1/Nrf2 pathway [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1511.
- [29] Bakunina N, Pariante C M, Zunszain P A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression [J]. *Immunology*, 2015, 144(3): 365-373.
- [30] 赖根祥, 朱桂东, 何慧明. 基于 Nrf2/HO-1 信号通路研究迷迭香酸对抑郁模型大鼠的保护作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(7): 1195-1201.
- [31] Li J D, Wang T Q, Liu P P, *et al.* Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD [J]. *Food Funct*, 2021, 12(9): 3898-3918.
- [32] 曾九僧, 陈力, 胡靖文, 等. 基于行为绝望模型柴当薄组抗抑郁有效部位筛选研究 [J]. *中药与临床*, 2022, 13(6): 63-69.

[责任编辑 李亚楠]