

## • 药理与临床 •

## 左归降糖解郁方调控小胶质细胞 CD300f 改善糖尿病并发抑郁症海马突触微环境损伤的机制研究

刘 检<sup>1</sup>, 赵洪庆<sup>2,3</sup>, 唐 林<sup>1</sup>, 杨 蕙<sup>1,2</sup>, 李 薇<sup>1</sup>, 蔺晓源<sup>1</sup>, 刘 林<sup>1\*</sup>, 王宇红<sup>2,3\*</sup>

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

2. 抑郁类疾病中医药防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

3. 湖南中医药大学 科技创新中心, 湖南 长沙 410208

**摘要:**目的 探讨左归降糖解郁方调控小胶质细胞免疫受体分子样家族成员 f (immune receptor molecule-like family member f, CD300f) 改善糖尿病并发抑郁症 (diabetes-related depression, DD) 海马突触微环境损伤的保护作用及机制。方法 原代分离、培养、纯化和鉴定小胶质细胞和海马神经元, 复制模拟 DD 环境下的海马突触微环境损伤体外细胞模型, 设置正常组、模型组、CD300f 阻断剂 CLM-1 组、左归降糖解郁方含药血清组和左归降糖解郁方含药血清+CLM-1 组。采用细胞成像分析观察小胶质细胞和海马神经元形态结构; 采用 ELISA 法检测细胞上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、吲哚胺 2,3-双加氧酶 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺 (dopamine, DA) 含量; 采用 CCK-8 实验及活死细胞染色评估海马神经元活性; 采用尼氏染色观察海马神经元突触损伤; 采用免疫荧光检测小胶质细胞中 CD300f、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 和海马神经元中突触素 (synaptophysin, SYN)、突触后密度蛋白 95 (postsynaptic density protein 95, PSD-95) 蛋白表达; 采用 Western blotting 检测 SYN、PSD-95 蛋白表达。**结果** 左归降糖解郁方能有效改善小胶质细胞和海马神经元形态结构损伤, 抑制细胞上清中神经炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IDO 水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 促进神经递质 5-HT、DA 水平 ( $P < 0.01$ ), 进而缓解海马神经元细胞活性及突触损伤。进一步的机制研究发现, 左归降糖解郁方能显著增加海马小胶质细胞中 CD300f 表达 ( $P < 0.01$ ), 降低 TLR4 表达 ( $P < 0.05$ ), 并上调海马神经元中突触前膜 SYN 和突触后膜 PSD-95 表达 ( $P < 0.01$ ), 最终抑制海马突触微环境损伤。**结论** 左归降糖解郁方能有效改善体外 DD 状态下的海马突触微环境损伤, 其机制可能与上调小胶质细胞 CD300f 有关。

**关键词:** 左归降糖解郁方; 糖尿病并发抑郁症; 小胶质细胞; CD300f; 海马神经元; 突触微环境; 马钱苷; 芍药苷; 丹酚酸 B; 毛蕊异黄酮苷; 梓醇

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)17-5841-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.011

## Mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on improving hippocampal synaptic microenvironment damage via regulating microglia CD300f in diabetes-related depression

LIU Jian<sup>1</sup>, ZHAO Hongqing<sup>2,3</sup>, TANG Lin<sup>1</sup>, YANG Hui<sup>1,2</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, LIN Xiaoyuan<sup>1</sup>, LIU Lin<sup>1</sup>, WANG Yuhong<sup>2,3</sup>

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

2. Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prevention &amp; Treatment of Depressive Diseases, Changsha 410208, China

3. Science &amp; Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

收稿日期: 2024-04-12

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82104793); 湖南省自然科学基金面上项目 (2022JJ30451); 湖南省三尖创新人才工程“湖湘青年英才”项目 (2022RC1226, 2021RC3102)

作者简介: 刘 检 (1986—), 男, 副研究员, 博士, 从事中药神经药理学研究。E-mail: 474299877@qq.com

\*通信作者: 王宇红 (1965—), 女, 研究员, 博士生导师, 从事中药创新药物研究。E-mail: wyh107@126.com

刘 林 (1984—), 男, 研究员, 硕士生导师, 从事中药创新药物研究。E-mail: 286410883@qq.com

**Abstract: Objective** To explore the protective effect and mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula (左归降糖解郁方) on regulating the immune receptor molecule like family member f (CD300f) of microglia to improve the hippocampal synaptic microenvironment damage in diabetes-related depression (DD). **Methods** Microglia and hippocampal neurons were primitively isolated, cultured, purified and identified. The *in vitro* cell model of hippocampal synaptic microenvironment damage was replicated and simulated in DD environment. The cultured cells were randomly divided into normal group, model group, CD300f blocker CLM-1 group, drug-containing serum of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula group, and drug-containing serum of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula + CLM-1 group. Morphology and structure of microglia and hippocampal neurons were observed by cell imaging analysis; ELISA was used to measure the contents of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and dopamine (DA) in the cell supernatant; The activity of hippocampal neurons was evaluated by CCK-8 assay and live/dead cell staining; Nissl's staining was used to observe synaptic damage in hippocampal neurons; The expressions of CD300f and Toll-like receptor 4 (TLR4) proteins in microglia as well as synaptophysin (SYN) and postsynaptic density protein 95 (PSD-95) in hippocampal neurons were detected by immunofluorescence staining; Western blotting was used to detect the expressions of SYN and PSD-95 proteins. **Results** Zuogui Jiangtang Jieyu Formula significantly improved the morphological and structural damage of microglia and hippocampal neurons, inhibited the levels of neuroinflammatory factor TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IDO in the cell supernatant ( $P < 0.05, 0.01$ ), promoted the levels of neurotransmitter 5-HT and DA ( $P < 0.01$ ), thereby alleviating hippocampal neuronal activity and synaptic damage. Further mechanism research found that Zuogui Jiangtang Jieyu Formula significantly increased the expression of CD300f in hippocampal microglia ( $P < 0.01$ ), reduced the expression of TLR4 ( $P < 0.05$ ), up-regulate the expressions of SYN in presynaptic membrane and PSD-95 in postsynaptic membrane of hippocampal neurons ( $P < 0.01$ ), ultimately inhibiting hippocampal synaptic microenvironment damage. **Conclusion** Zuogui Jiangtang Jieyu Formula can effectively improve the hippocampal synaptic microenvironment damage in the state of DD *in vitro*, and its mechanism may be related to the up-regulation of microglial CD300f.

**Key words:** Zuogui Jiangtang Jieyu Formula; diabetes-related depression; microglia; CD300f; hippocampal neuron; synaptic microenvironment; loganin; paeoniflorin; salviolic acid B; calycosin-7-glucoside; catalpol

目前全球糖尿病患者为 5.37 亿，其中我国患者高达 1.41 亿，位列世界第一<sup>[1]</sup>。普通人群中抑郁症的发病率为 6.8%，而糖尿病患者中 60%~75%伴有抑郁情绪，且糖尿病并发抑郁症发病隐匿，其中枢机制仍不明确，现有研究多围绕学习记忆及情绪行为调控中枢海马展开，但缺乏深入研究<sup>[2-3]</sup>。突触微环境是指神经元突触及其所处的内外部环境，主要包括神经元及其突触结构、胶质细胞和神经递质等<sup>[4-5]</sup>，小胶质细胞与神经元之间的信息传递与信号转导在重塑突触微环境过程中发挥关键作用。尽管突触微环境已成为神经系统疾病的重要攻关点，但在糖尿病并发抑郁症研究中仍存在大量空白。因此，以小胶质细胞和神经元对话介导的突触微环境损伤将成为糖尿病并发抑郁症中枢机制探索的新方向。

糖尿病并发抑郁症属中医“消渴”合并“郁证”范畴<sup>[6]</sup>。课题组基于糖尿病并发抑郁症“虚、瘀、郁”中医病机特点，创“滋阴益气、化瘀解郁”治法，由经典方左归丸加减化裁而成左归降糖解郁方<sup>[7]</sup>。前期研究发现左归降糖解郁方对海马突触微环境损伤具有保护作用，其机制与调控海马神经元线粒体自噬介导的凋亡有关<sup>[8]</sup>。由于突触微环境受内外部环境

的多种因素影响，故本研究拟通过体外细胞实验，以小胶质细胞-神经元对话为切入点，从神经免疫和突触损伤层面，进一步明确左归降糖解郁方改善海马突触微环境损伤的机制与靶点。

## 1 材料

### 1.1 动物

新生 SPF 级雄性 SD 大鼠 6 只 (3~4 d)，孕 16~17 d 的 SPF 级雌性 SD 大鼠 3 只 (10 周龄)，体质量为 180~220 g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠 6 只 (8 周龄)，均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，实验动物许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。动物实验经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准 (批准号 ZYFY-20211008-51)。

### 1.2 药材

左归降糖解郁方由熟地黄 15 g、山茱萸 12 g、枸杞 12 g、菟丝子 9 g、贯叶金丝桃 3 g、丹参 12 g、牡丹皮 6 g、姜黄 9 g、牛膝 9 g、杜仲 9 g、黄芪 18 g 组成，上述药材饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院，并经湖南中医药大学第一附属医院药学部张志国教授分别鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的块根经加工蒸晒而成、山茱萸科

植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉、茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实、旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子、藤黄科植物贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L. 的干燥地上部分、唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎、毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮、姜科植物姜黄 *Curcuma Longa* L. 的干燥根茎、苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根、杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮、豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根, 均符合《中国药典》2020年版规定。所有药材一次性备齐后, 由湖南中医药大学第一附属医院制剂中心按处方比例, 水煎后浓缩至制备含药血清的所需浓度。课题组前期采用 LC-MS/MS 共鉴定出左归降糖解郁方的 30 种化学成分, 并对其中 5 种主要成分进行了定量分析, 含马钱苷 3.48 mg/g、芍药苷 2.05 mg/g、丹酚酸 B 1.08 mg/g、毛蕊异黄酮苷 1.66 mg/g 和梓醇 2.46 mg/g<sup>[9]</sup>。

### 1.3 药品与试剂

高糖 (批号 107W021) 购自北京索莱宝科技有限公司; 皮质酮 (批号 C2505)、Neuronbasal 培养基 (批号 2458319)、B27 (批号 2283823) 购自美国 Gibco 公司; 免疫受体分子样家族成员 f (immune receptor molecule-like family member f, CD300f) 阻断剂 CLM-1 (批号 P71561) 购自美国 MedChemExpress 公司; CCK-8 试剂盒 (批号 BB07018303) 购自北京博奥森生物技术有限公司; Calcein-AM/PI 活死细胞染色试剂盒 (批号 CA1630) 购自北京索莱宝科技有限公司; 离子化钙结合适配分子 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, IBA1) 抗体 (批号 AF301643) 购自艾方生物科技有限公司; 神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE) 抗体 (批号 AF301643) 购自博士德生物科技有限公司; CD300f 抗体 (批号 8069784)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 抗体 (批号 82692227)、突触素 (synaptophysin, SYN) 抗体 (批号 6531286)、突触后密度蛋白 95 (postsynaptic density protein 95, PSD-95) 抗体 (批号 7844913) 购自美国 Affinity 公司;  $\beta$ -actin 抗体 (批号 B2801)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 RS0011) 购自 Immunoway 公司; FITC 标记的山羊抗兔荧光二抗

(批号 2000560)、Cy3 标记的山羊抗小鼠荧光二抗 (批号 2000433) 购自 Proteintech 公司; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 试剂盒 (批号 2311R16)、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 试剂盒 (批号 2311R19)、吲哚胺 2,3-双加氧酶 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 试剂盒 (批号 2311R30)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 试剂盒 (批号 2311R15)、多巴胺 (dopamine, DA) 试剂盒 (批号 2311R14) 均购自江苏菲亚生物科技有限公司。

### 1.4 仪器

Galaxy170R 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (德国 Eppendorf 公司); L530R 型台式低速冷冻离心机 (湖南湘仪实验仪器开发有限公司); S8PAO 型电视显微镜 (德国莱卡公司); Enspire 型多功能酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司); MPTC 型蛋白印记系统 (美国 Bio-Rad 公司); LSM800 型超高分辨率激光共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司)。

## 2 方法

### 2.1 原代小胶质细胞、海马神经元的分离、培养及鉴定

参照课题组前期方法<sup>[10-11]</sup>, 取新生 3~4 d 的 SD 大鼠海马组织, 经消化、终止、重悬、过筛、离心、差速贴壁纯化等操作后, 将培养的小胶质细胞接种至预先蜡柱处理的 24 孔板中, 3 d 后全量换液, 后续每隔 3~5 d 视情况按 1/3 量换液, 备用。另取孕 16~17 d 的 SD 大鼠全脑, 分离海马组织, 经消化、终止、重悬、过筛、离心等操作后, 将细胞接种至预先包被多聚赖氨酸爬片的 24 孔板中, 4 h 后全量换液为含 2% B27 的 Neurobasal 无血清培养基, 继续培养 5~7 d 后, 备用。分别采用特异性标志物 IBA1 和 NSE 对原代小胶质细胞和海马神经元进行鉴定。

### 2.2 含药血清的制备

左归降糖解郁方组大鼠按成人临床等效剂量的 3 倍给药, 每日 2 次, 连续 3 d, 末次给药 1 h 后, 大鼠腹主动脉取血, 4 500 r/min 离心 10 min, 收集血清, 置于 56 °C 水浴锅灭活处理 30 min 后, 1 200 r/min 离心 5 min, 收集上清, 采用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过除菌后, 分装至 EP 管中, -80 °C 冰箱保存, 备用。

### 2.3 体外细胞共培养体系的构建、模型制备、分组及给药

参考课题组前期成熟的模型制备及文献方

法<sup>[8,11]</sup>,将上述接种5~7 d成熟海马神经元的细胞爬片倒扣,置于小胶质细胞培养板的蜡柱上,共培养2~3 d后,采用高糖(150 mmol/L)联合皮质酮(200 μmol/L)干预18 h,即可构建模拟糖尿病并发抑郁症环境下的海马突触微环境损伤细胞模型(图1),并以细胞形态、细胞活力、单胺类神经递质及突触损伤等指标来判断造模成功与否<sup>[12-13]</sup>。随后将细胞随机分为正常组、模型组、CD300f 阻断剂 CLM-1 组、左归降糖解郁方含药血清组、左归降糖解郁方含药血清+CLM-1 组(由于课题组前期体外细胞实验中已证实空白血清对药效无影响<sup>[14]</sup>,故本研究不再设空白血清对照组)。除正常组和模型组加入等量的培养液外,CLM-1 组加入终质量浓度为1 μg/mL 的 CLM-1,左归降糖解郁方含药血清组加入10%含药血清,左归降糖解郁方含药血清+CLM-1 组则联合加入1 μg/mL CLM-1 及10%含药血清,干预24 h后按要求收集各组细胞样本,用于后续指标检测。

## 2.4 指标检测

**2.4.1 细胞形态学观察** 各组经造模及给药干预后,采用细胞成像分析观察各组原代小胶质细胞和海马神经元的形态结构变化情况。

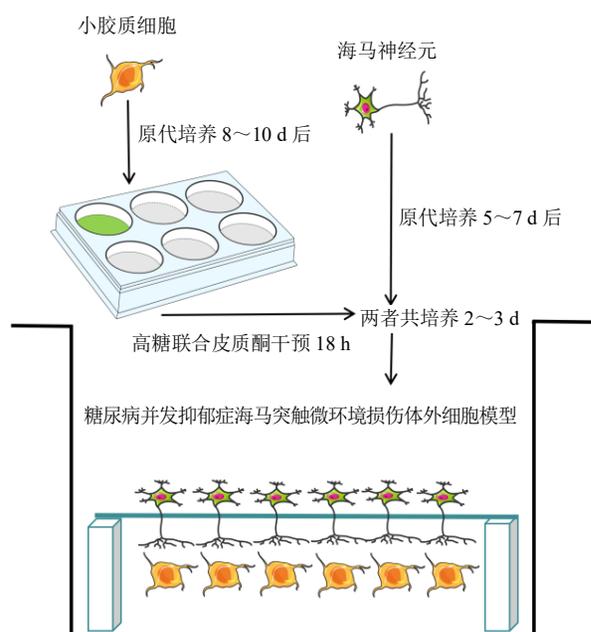


图1 海马突触微环境体外培养体系及糖尿病并发抑郁症模型的建立

Fig. 1 Establishment of hippocampal synaptic microenvironment culture system *in vitro* and diabetes-related depression model

**2.4.2 细胞活力检测** 各组经造模及给药干预后,每组各孔加入50 μL CCK-8 工作液,继续孵育4 h,另设置不接种细胞不含药物的空白孔,采用多功能酶标仪测定450 nm 处各孔海马神经元的吸光度(A)值,并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{正常}} - A_{\text{空白}})$$

**2.4.3 尼氏染色** 各组经造模及给药干预后,弃液,将海马神经元分别经4%细胞组织固定液固定30 min 和0.25% Triton-100 透化10 min 后;加入0.0004% FITC-FJB 工作液,4 °C 避光孵育60 min,弃液;加入DAPI 工作液,室温避光孵育20 min,最后于激光共聚焦显微镜上进行荧光检测,并观察各组神经元海马神经元树突分支、树突棘和胞体的形态结构变化。

**2.4.4 活死细胞染色** 各组经造模及给药干预后,弃液,加入Calcein-AM/PI 工作液,37 °C 避光孵育20 min,于激光共聚焦显微镜下观察各组活细胞和死细胞个数,其中红色代表死细胞,绿色代表活细胞,计算细胞死亡率。

$$\text{细胞死亡率} = \text{死细胞个数} / (\text{死细胞个数} + \text{活细胞个数})$$

**2.4.5 炎症因子和神经递质检测** 各组经造模及给药干预后,收集共培养体系中的细胞上清液,3 000 r/min 离心10 min,取上清,按照试剂盒说明书检测各组细胞上清中TNF-α、IL-1β、IDO、5-HT、DA 含量。

**2.4.6 免疫荧光检测** 各组细胞经造模及给药干预后,分别经4%细胞组织固定液固定30 min、0.25% Triton-100 透化10 min 和5%牛血清白蛋白封闭30 min 后,其中小胶质细胞加入CD300f (1:100)、TLR4 (1:200) 一抗稀释液,海马神经元加入SYN (1:100)、PSD-95 (1:100) 一抗稀释液,4 °C 湿盒避光孵育过夜;加入山羊抗兔荧光二抗后37 °C 避光孵育30 min;加入DAPI 工作液室温避光孵育20 min,最后于激光共聚焦显微镜检测,并以相对荧光强度值来表示各组蛋白表达水平。

**2.4.7 Western blotting 检测 SYN、PSD-95 蛋白表达** 各组经造模及给药干预后,收集海马神经元细胞,加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA 蛋白裂解液,提取总蛋白并定量,随后经变性、电泳、转膜和封闭等处理后,分别加入兔抗大鼠 SYN (1:800)、PSD-95 (1:500) 一抗稀释液,4 °C 孵育过夜,加入HRP 标记的二抗,摇床中室温孵育60 min,最后进行显色并采用超灵敏多色荧光成像分析系统

进行曝光及灰度值计算，计算各组蛋白的相对表达水平。

### 2.5 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行处理，数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。先对数据进行方差齐性检验，不同组间比较采用 One-Way ANOVA 分析，其中方差齐性采用 LSD 检验，方差非齐性采用 Dunnett's T3 检验。

## 3 结果

### 3.1 小胶质细胞和海马神经元形态学及特异性标志物鉴定

如图 2 所示，光镜下可见原代小胶质细胞突起不规则，分支多，呈单极或多极分支状，原代海马神经元亦呈现典型的神经元生长特征，神经网络丰富，轴突和树突相互交叠。免疫荧光染色鉴定结果

显示，其二者特异性标志物 IBA1、NSE 均阳性表达，提示所培养的原代细胞均为目标细胞，可用于后续实验。

### 3.2 左归降糖解郁方对小胶质细胞和神经元形态学的影响

如图 3 所示，与正常组比较，模型组小胶质细胞明显活化，分支变短、变少，呈阿米巴样，海马神经元树突及树突棘断裂，神经网络缺失；与模型组比较，CLM-1 组小胶质细胞和海马神经元基础结构损伤进一步加重，而左归降糖解郁方含药血清能有效改善上述 2 种细胞形态结构受损，并逆转 CLM-1 所致的细胞损伤加重，提示左归降糖解郁方可调控 CD300f 进而抑制小胶质细胞和海马神经元形态结构损伤。

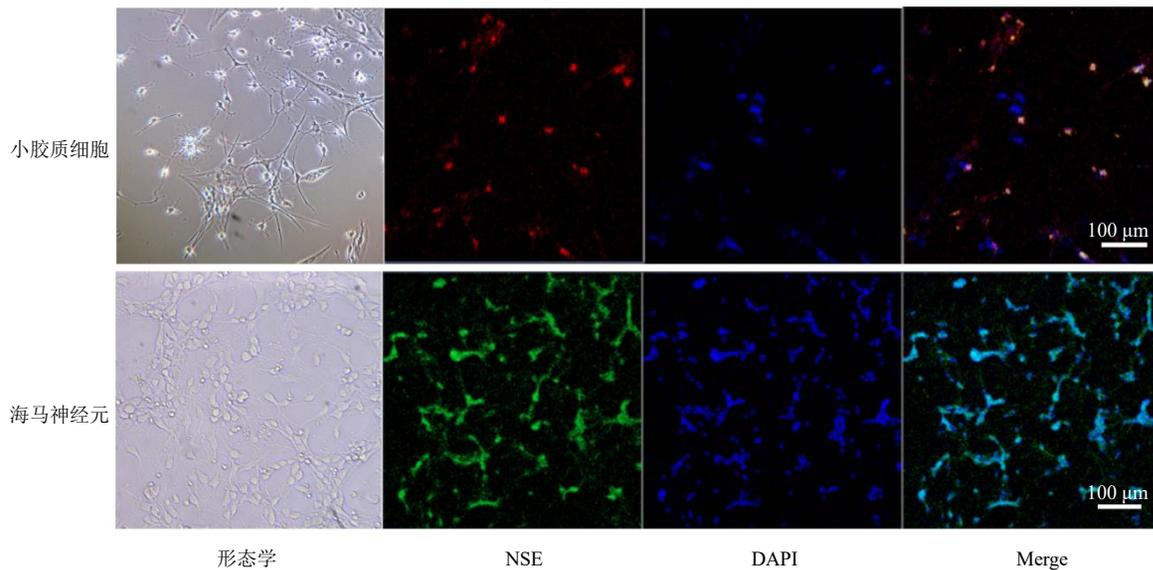


图 2 小胶质细胞和海马神经元鉴定 (×100)

Fig. 2 Identification of microglia and hippocampal neuron (× 100)

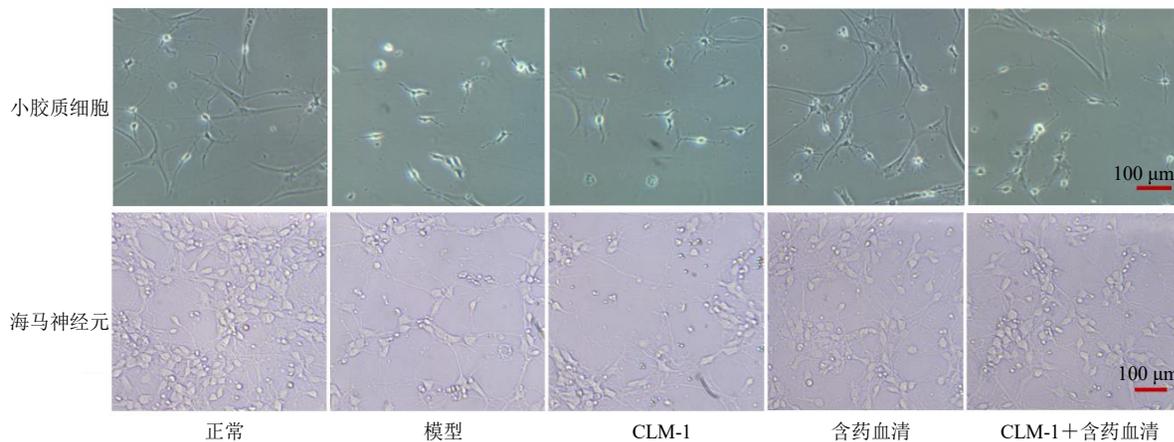


图 3 细胞形态学变化 (×100)

Fig. 3 Morphological changes of cells (× 100)

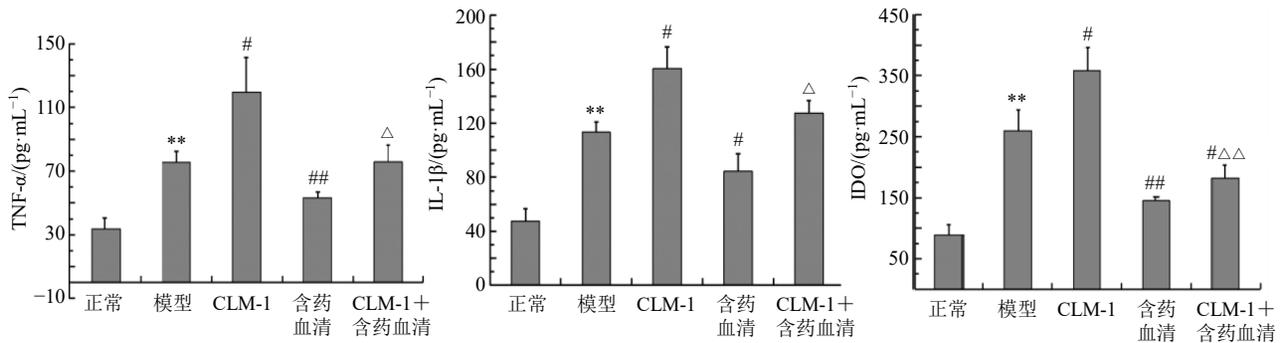
### 3.3 左归降糖解郁方对神经炎症相关因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IDO 含量的影响

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IDO 是重要的神经炎症因子, 如图 4 所示, 与正常组比较, 模型组细胞上清液中神经炎症相关因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IDO 含量明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, CLM-1 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IDO 含量进一步升高 ( $P < 0.05$ ), 而左归降糖解郁方含药血清能显著抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IDO 含量 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 与 CLM-1 组比较, 左

归降糖解郁方联合 CLM-1 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IDO 含量显著下降 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 提示左归降糖解郁方可有效逆转 CD300f 下调所致的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IDO 含量异常升高。

### 3.4 左归降糖解郁方对小胶质细胞中 CD300f、TLR4 表达的影响

通过免疫荧光检测分别评估小胶质细胞中 CD300f、TLR4 蛋白表达情况, 如图 5 所示, 与正常组比较, 模型组小胶质细胞中 CD300f 表达减少、



与正常组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 与 CLM-1 组比较:  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$ , 下图同。  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs normal group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group;  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$  vs CLM-1 group, same as below figures.

图 4 左归降糖解郁方对细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IDO 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 4 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IDO in cell supernatant ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

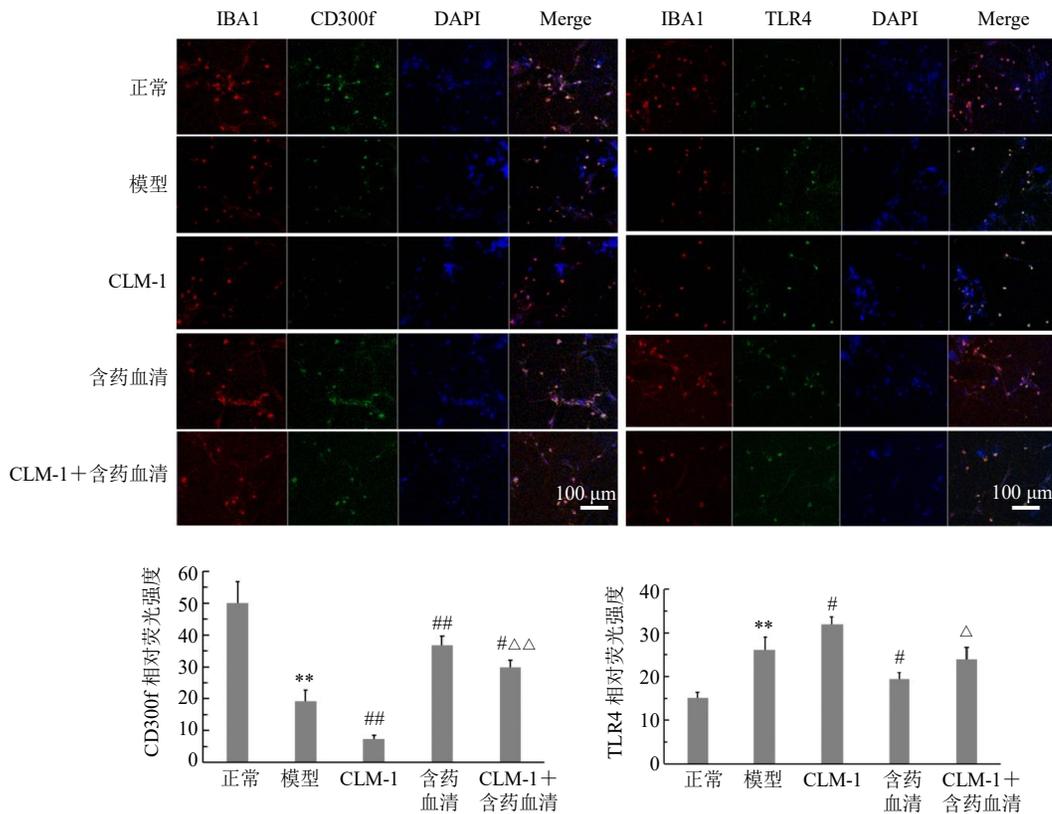


图 5 左归降糖解郁方对小胶质细胞中 CD300f 和 TLR4 表达的影响 ( $\times 100, \bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on expressions of CD300f and TLR4 in microglia ( $\times 100, \bar{x} \pm s, n = 3$ )

TLR4 表达增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, CLM-1 组 CD300f、TLR4 表达分别进一步下调或上调 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 而左归降糖解郁方含药血清能显著抑制 CD300f 下调、TLR4 上调 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 并逆转 CLM-1 所致的 CD300f、TLR4 蛋白表达异常降低或升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 提示左归降糖解郁方对小胶质细胞中 CD300f、TLR4 蛋白表达异常具有明显的调控作用。

### 3.5 左归降糖解郁方对海马神经元细胞活性的影响

细胞存活率及活死细胞比率是体现细胞活性的重要指标, 如图 6 所示, CCK-8 检测结果显示, 与正常组比较, 模型组海马神经元细胞存活率明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, CLM-1 组细胞存活率下降 ( $P < 0.05$ ), 而左归降糖解郁方含药血清组细胞存活率显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与 CLM-1 组比较, 左归降糖解郁方联合 CLM-1 组细胞存活率显著升高 ( $P < 0.01$ ), 这提示左归降糖解郁方含药血清能

有效提升模拟糖尿病并发抑郁症环境下海马神经细胞存活率, 并有效逆转 CD300f 阻断剂 CLM-1 所致的细胞存活率显著减少。

Calcein-AM/PI 活死细胞染色结果发现, 如图 6 所示, 与正常组比较, 模型组海马神经元死细胞/活细胞比率明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, CLM-1 组、左归降糖解郁方含药血清组死细胞/活细胞比率分别显著升高、降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 且左归降糖解郁方联合 CLM-1 给药干预后, 海马神经元死细胞/活细胞比率下降情况被逆转 ( $P < 0.05$ ), 提示左归降糖解郁方也能有效保护海马神经元细胞活性, 抑制神经元死亡, 其机制可能与上调 CD300f 有关。

### 3.6 左归降糖解郁方对海马神经元突触损伤及神经递质的影响

尼氏染色是检测神经元突触损伤的重要指标, 如图 7 所示, 与正常组比较, 模型组海马神经元内尼氏小体数量明显减少, 树突分支、树突棘断裂,

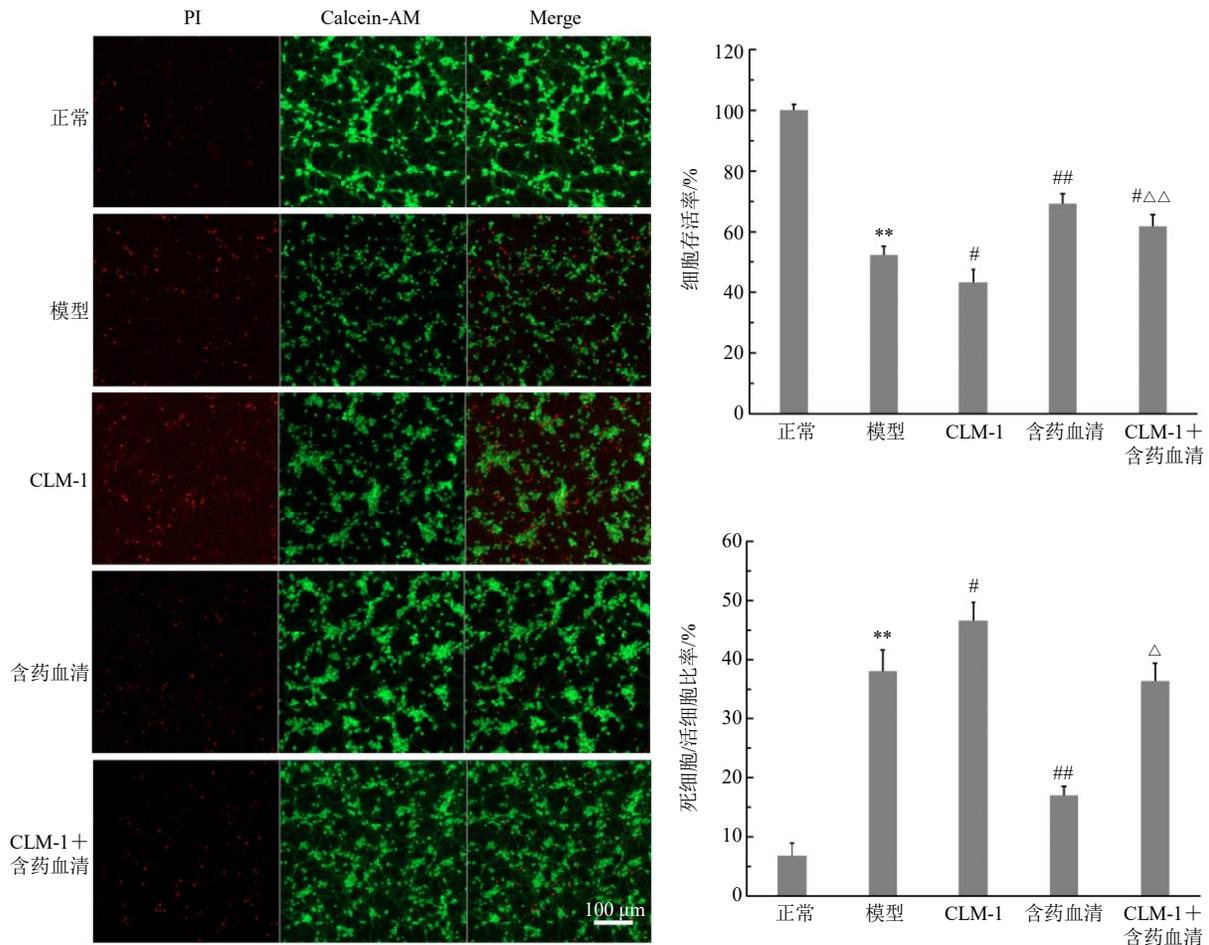


图 6 左归降糖解郁方对海马神经元细胞活性的影响 ( $\times 100$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

Fig. 6 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on activity of hippocampal neurons ( $\times 100$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

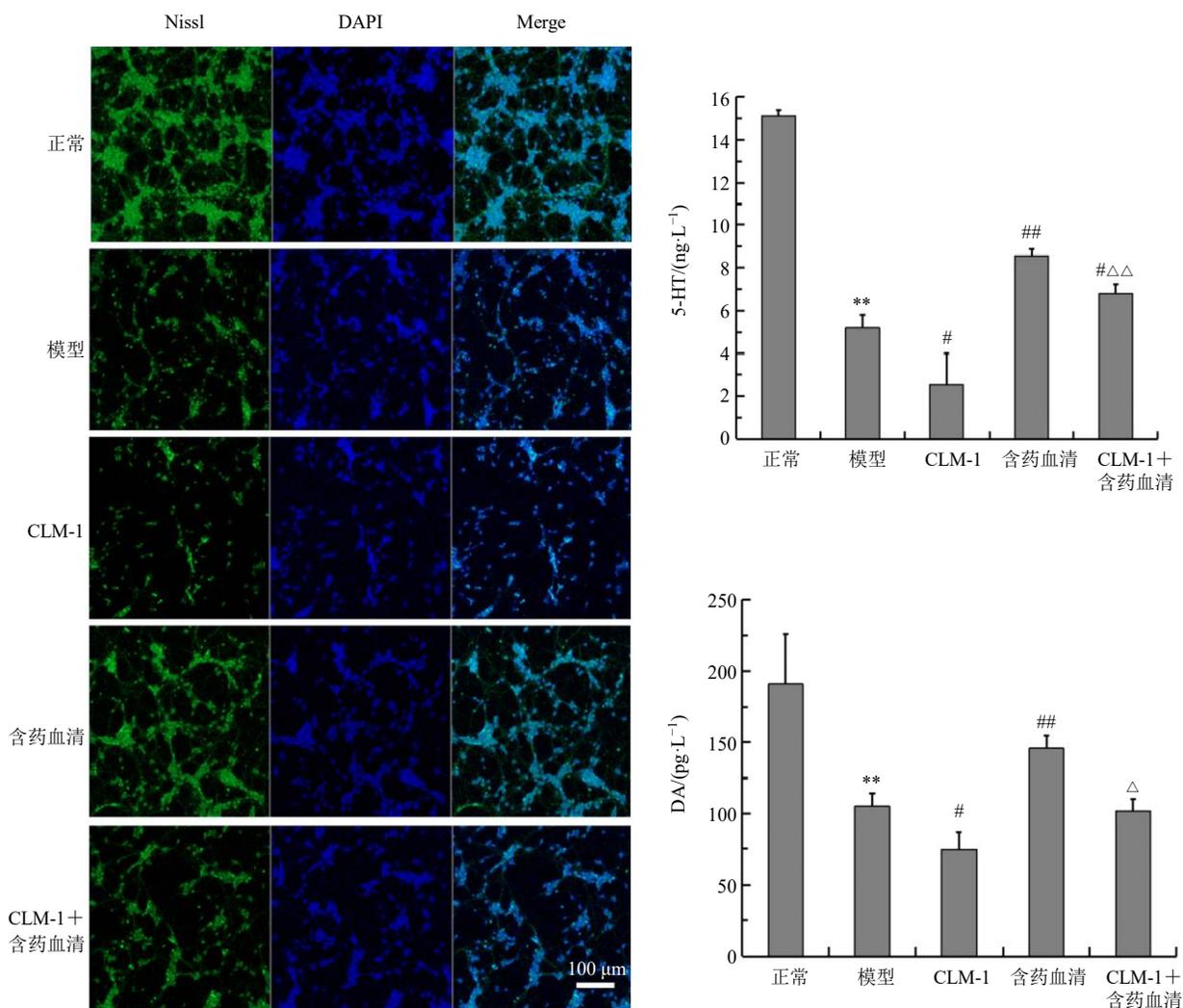


图7 左归降糖解郁方对海马神经元突触损伤及神经递质水平的影响 (×100,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on synaptic damage and neurotransmitter levels in hippocampal neurons (× 100,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

呈现明显的突触形态结构损伤；与模型组比较，CLM-1组、左归降糖解郁方含药血清组突触损伤分别加重、减轻，且左归降糖解郁方含药血清能显著逆转CLM-1引起的海马神经元突触受损。

此外，神经递质5-HT、DA检测结果显示，与正常组比较，模型组细胞上清液中5-HT、DA水平明显降低 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，CLM-1组5-HT、DA水平下降 ( $P < 0.05$ )，而左归降糖解郁方含药血清组上述神经递质水平显著增加 ( $P < 0.01$ )；与CLM-1组比较，左归降糖解郁方联合CLM-1组5-HT、DA水平明显升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )，提示左归降糖解郁方含药血清能有效提升模拟糖尿病并发抑郁症环境下单胺类神经递质5-HT、DA水平。

### 3.7 左归降糖解郁方对海马神经元中突触相关蛋白SYN、PSD-95表达的影响

SYN、PSD-95分别是神经元突触前膜与突触后膜关键蛋白，其损伤与突触微环境改变密切相关，如图8所示，免疫荧光检测结果显示，与正常组比较，模型组海马神经元中SYN、PSD-95表达均明显降低 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，CLM-1组SYN表达下调 ( $P < 0.05$ )，PSD-95表达也有下调趋势但无显著性差异，左归降糖解郁方含药血清能显著上调SYN、PSD-95表达水平 ( $P < 0.01$ )，并逆转CLM-1引起的上述2个蛋白表达异常减少 ( $P < 0.01$ )。

此外，采用Western blotting分别检测了SYN、PSD-95表达情况，如图9所示，与正常组比较，模

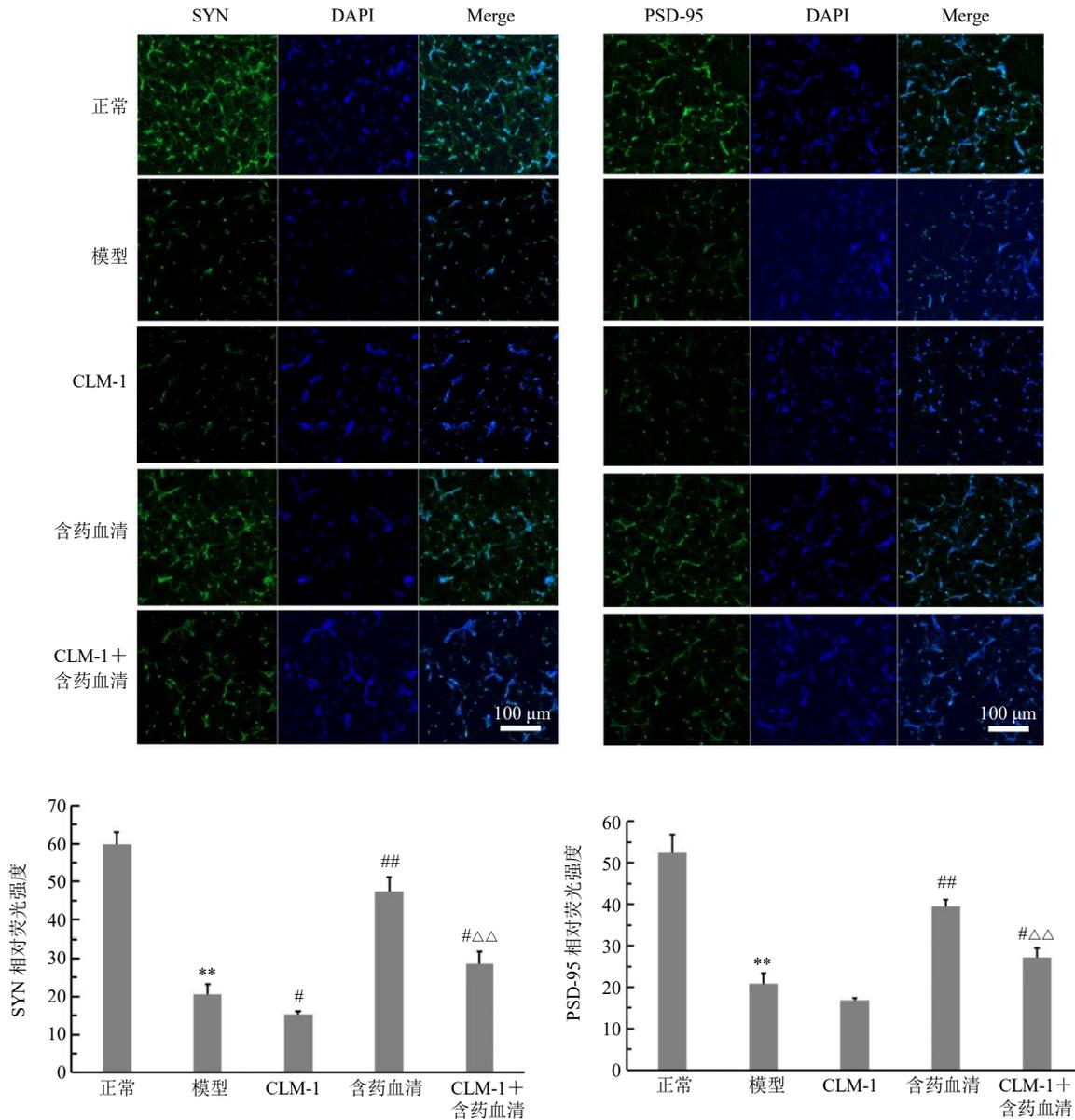


图8 左归降糖解郁方对海马神经元中 SYN、PSD-95 表达的影响 ( $\times 100$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 8 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on expressions of SYN and PSD-95 in hippocampal neurons ( $\times 100$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

型组 SYN、PSD-95 表达下降 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, CLM-1 组 SYN 表达进一步降低 ( $P < 0.05$ ), PSD-95 表达有下降趋势但无显著性差异, 左归降糖解郁方含药血清显著上调 SYN、PSD-95 表达 ( $P < 0.01$ ), 并逆转 CLM-1 所致的 SYN、PSD-95 表达异常降低 ( $P < 0.01$ ), 再次证实了左归降糖解郁方对海马神经元中 SYN、PSD-95 表达异常具有明显的调控作用, 且其机制与上调 CD300f 表达有关。

#### 4 讨论

突触微环境包含小胶质细胞、炎症因子、神经

递质、海马神经元及其突触结构等, 研究表明, 突触作为神经元末梢的特殊结构, 与其所处的内外部环境密不可分<sup>[15-16]</sup>, 一方面, 炎症因子会直接或间接引起突触周围细胞微环境改变, 进而影响突触正常功能的发挥; 另一方面, 神经递质失衡也会导致突触可塑性功能变化, 由于海马神经元突触可塑性损伤是糖尿病并发抑郁症发生的重要原因, 而突触微环境的改变又是影响突触可塑性的关键因素, 故海马突触微环境损伤与糖尿病并发抑郁症发生的中枢机制密切相关。

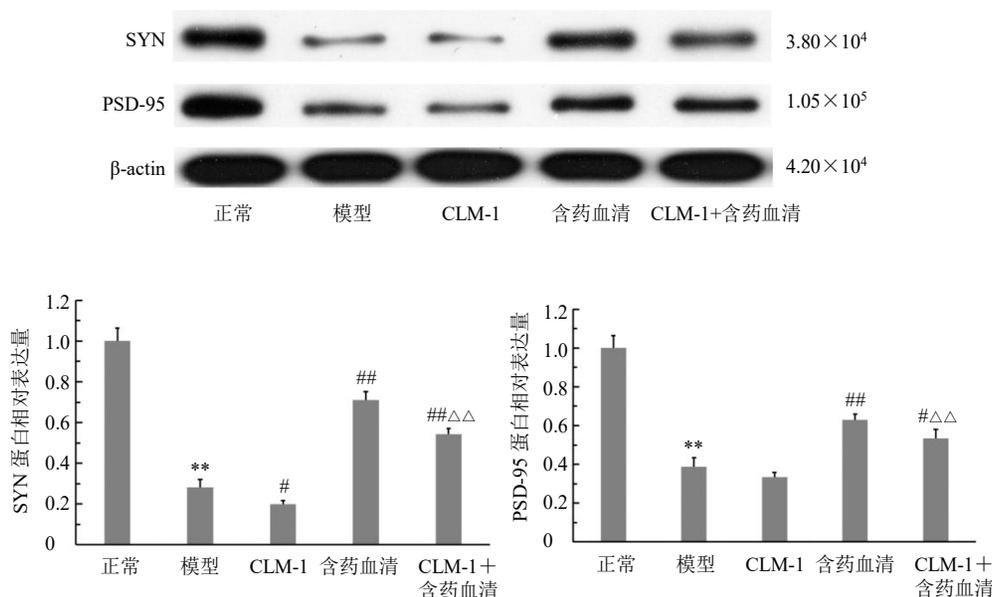


图9 左归降糖解郁方对海马神经元中 SYN、PSD-95 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 9 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on expressions of SYN and PSD-95 in hippocampal neurons ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

课题组前期研究已发现，左归降糖解郁方对线粒体自噬介导的海马神经元凋亡致糖尿病并发抑郁症海马突触微环境损伤具有明显的保护作用<sup>[8]</sup>。然而突触微环境易受多种因素影响，特别是神经内分泌免疫等信号的影响，但具体机制仍不清楚<sup>[17]</sup>。研究认为，小胶质细胞 CD300f 介导的炎症反应通过免疫信号传递引起神经元突触损伤，进而致海马突触微环境异常改变<sup>[18]</sup>。动物实验也显示，抑郁症肝郁脾虚证大鼠小胶质细胞过度激活，免疫炎症反应增强，海马中 PSD-95 和 SYN 表达下调，同时 CA1 区锥体神经元及其线粒体、突触等超微结构明显受损<sup>[19]</sup>。由此推测 CD300f 在介导小胶质细胞-神经元对话进而调控海马突触微环境中发挥重要作用。

为了证实该假说，本研究通过原代分离、培养、纯化和鉴定小胶质细胞和海马神经元，构建了模拟糖尿病并发抑郁症脑环境下的海马突触微环境损伤细胞模型。本研究成功获得原代小胶质细胞和海马神经元，且两者特异性标志物 IBA1、NSE 均呈阳性表达。此外，与正常组相比，模型组小胶质细胞呈明显活化的阿米巴样，海马神经元树突、树突棘及神经网络明显断裂，细胞上清液中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IDO 含量升高，而单胺神经递质 5-HT、DA 水平降低，同时 CCK-8 实验及尼氏染色发现海马神经元细胞活性下降和突触明显受损，这提示糖尿病并发抑郁症细胞模型复制成功，同时小胶质细胞-神经元之间信号串扰异常可能造成了突触微环境中炎

症因子升高、单胺神经递质下降、小胶质细胞形态和海马神经元突触损伤。与模型组比较，CD300f 阻断剂 CLM-1 加重了上述异常改变与损伤过程，而左归降糖解郁方不仅逆转 CLM-1 所致小胶质细胞异常活化，缓解海马神经元形态、活性及突触损伤，还能抑制炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IDO 升高，并提升神经递质 5-HT、DA 水平，故提示左归降糖解郁方可能是通过调控小胶质细胞 CD300f 相关信号进而改善海马突触微环境损伤。

CD300f 属于 CD300 免疫受体分子样家族成员，研究发现 CD300f 调控的小胶质细胞代谢和突触修剪活动可能与重度抑郁症的抑郁样行为有关<sup>[20]</sup>。CD300f<sup>-/-</sup>小鼠表现出一些明显的抑郁行为特征，包括抑郁样行为学改变、小胶质细胞数量增多、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量显著增加，这提示 CD300f 免疫受体在调控小胶质细胞免疫激活和重度抑郁样行为过程中发挥了重要作用<sup>[21]</sup>。色氨酸是维持细胞活化和增殖的必需氨基酸，同时也是生成 5-HT 的主要成分，IDO 是肝脏以外催化色氨酸沿着犬尿氨酸途径分解代谢的限速酶<sup>[22]</sup>。在糖尿病状态下，促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、干扰素等进入中枢后，通过 IDO 将 5-HT 的前体色氨酸转化为犬尿氨酸，从而使 5-HT 的合成显著下降，影响单胺类神经递质的合成及再摄取<sup>[23]</sup>，同时其还可以通过生成喹啉酸，激活 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体，造成神经元兴奋性毒性进而影响突触可塑性功

能<sup>[24]</sup>。此外有研究表明, CD300f 能抑制 TLR4 介导的促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等生成, 进而调控色氨酸-犬尿酸代谢途径而改善海马神经递质代谢失衡和突触可塑性损伤<sup>[25-26]</sup>, 提示 CD300f 异常通过小胶质细胞免疫介导的神经递质代谢失衡是造成海马突触微环境损伤的重要原因。

故本研究通过小胶质细胞和神经元体外共培养, 并采用 CD300f 阻断剂 CLM-1 及其联合左归降糖解郁方含药血清干预。进一步的机制研究发现, 与正常组比较, 模型组小胶质细胞中 CD300f 表达

下降、TLR4 表达增加, 海马神经元中突触前膜蛋白 SYN 和突触后膜蛋白 PSD-95 表达均明显降低。给予 CLM-1 干预处理后, 与模型组比较, CD300f、TLR4 表达分别进一步下调和上调, 同时突触相关蛋白 SYN、PSD-95 表达也更加减少, 这提示小胶质细胞 CD300f/TLR4 信号异常可能参与了海马神经元突触损伤过程。左归降糖解郁方不但能改善模型状态下 CD300f、SYN、PSD-95 蛋白表达下调和 TLR4 表达上调, 还能有效逆转 CLM-1 干预后的上述蛋白表达异常情况。具体机制见图 10。

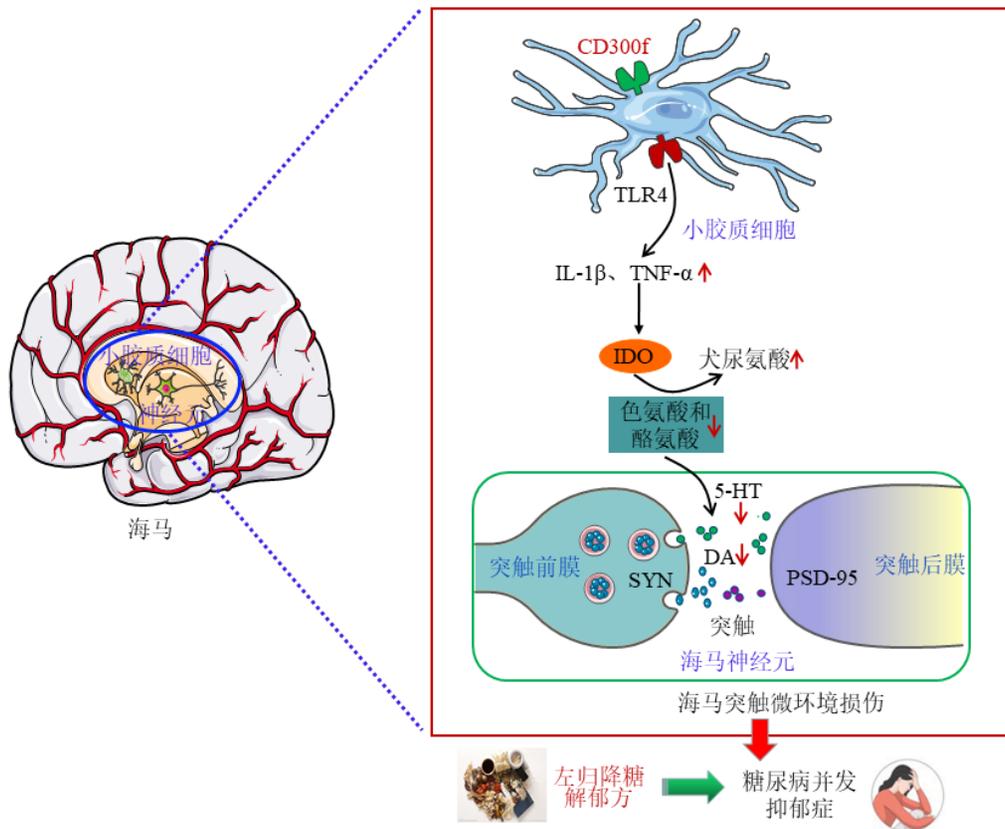


图 10 左归降糖解郁方调控小胶质细胞 CD300f 改善糖尿病并发抑郁症海马突触微环境损伤的分子机制

Fig. 10 Mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on improving hippocampal synaptic microenvironment damage via regulating microglia CD300f in diabetes-related depression

综上, 基于突触微环境包含小胶质细胞、炎症因子、神经递质、海马神经元及其突触这一整体单元, 左归降糖解郁方则能明显改善模拟糖尿病并发抑郁症环境下的海马突触微环境损伤, 其机制与上调小胶质细胞 CD300f 有关, 这可能是其防治糖尿病并发抑郁症的重要机制, 同时为中医药整体观、多环节、多靶点的治疗特色奠定实验依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**参考文献**

[1] Belko S, Hutchinson M, Hayden G, et al. Co-designing

diabetes care with patients [J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2024, 18(1): 53-58.

[2] Bai S, Wang J S, Liu J T, et al. Analysis of depression incidence and influence factors among middle-aged and elderly diabetic patients in China: Based on CHARLS data [J]. *BMC Psychiatry*, 2024, 24(1): 146.

[3] Li S X, Yang D, Zhou X H, et al. Neurological and metabolic related pathophysiologicals and treatment of comorbid diabetes with depression [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(4): e14497.

[4] Ren F F, Guo R J. Synaptic microenvironment in

- depressive disorder: Insights from synaptic plasticity [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2021, 17: 157-165.
- [5] Contini D, Holstein G R, Art J J. Synaptic cleft microenvironment influences potassium permeation and synaptic transmission in hair cells surrounded by calyx afferents in the turtle [J]. *J Physiol*, 2020, 598(4): 853-889.
- [6] 蔺晓源, 韩远山, 孟盼, 等. 糖尿病并发抑郁症“虚、瘀、郁”的中医病机探讨 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(8): 1942-1943.
- [7] 张驰, 周思倩, 李金来, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的左归降糖解郁方体外成分分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(2): 228-240.
- [8] 刘检, 张尚霞, 刘林, 等. 基于线粒体自噬介导的凋亡探讨左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁证海马突触微环境损伤的保护作用 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(4): 2012-2018.
- [9] 杨蕙, 雷诗卉, 李薇, 等. 左归降糖解郁方调控经典 Wnt 信号改善糖尿病并发抑郁证海马神经干细胞增殖与分化研究 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2163-2171.
- [10] 刘检, 王宇红, 凌佳, 等. 优化的 SD 大鼠小胶质细胞原代培养、纯化及采用高内涵细胞成像分析技术进行的细胞鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2018, 35(11): 968-973.
- [11] 刘检, 王宇红, 徐雅岚, 等. 改良的胎鼠海马神经元原代培养及模拟糖尿病并发抑郁环境对其的损伤作用 [J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(4): 459-465.
- [12] Liu J, Wang Y H, Li W, *et al.* Structural and functional damage to the hippocampal neurovascular unit in diabetes-related depression [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(2): 289-297.
- [13] Kaeck S, Banker G. Culturing hippocampal neurons [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(5): 2406-2415.
- [14] 刘检, 刘林, 唐林, 等. 左归降糖解郁方对自噬介导的糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经血管单元中神经元损伤的保护作用及其机制 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2420-2427.
- [15] Bellingacci L, Canonichesi J, Mancini A, *et al.* Cytokines, synaptic plasticity and network dynamics: A matter of balance [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(12): 2569-2572.
- [16] Caragher S P, Hall R R, Ahsan R, *et al.* Monoamines in glioblastoma: Complex biology with therapeutic potential [J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20(8): 1014-1025.
- [17] Heller J P, Rusakov D A. Morphological plasticity of astroglia: Understanding synaptic microenvironment [J]. *Glia*, 2015, 63(12): 2133-2151.
- [18] Evans F, Ali-Ruiz D, Rego N, *et al.* CD300f immune receptor contributes to healthy aging by regulating inflammaging, metabolism, and cognitive decline [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(10): 113269.
- [19] 严志祎. 抑郁症肝郁脾虚证小鼠 RIPK1/RIPK3/MLKL 介导的坏死性凋亡发生机制及逍遥散的调节作用 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [20] Dempsey L A. CD300f in depression [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(5): 488.
- [21] Lago N, Kaufmann F N, Negro-Demontel M L, *et al.* CD300f immunoreceptor is associated with major depressive disorder and decreased microglial metabolic fitness [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(12): 6651-6662.
- [22] Savonije K, Meek A, Weaver D F. Indoleamine 2,3-dioxygenase as a therapeutic target for Alzheimer's disease and geriatric depression [J]. *Brain Sci*, 2023, 13(6): 852.
- [23] Leonard B E. Inflammation and depression: A causal or coincidental link to the pathophysiology? [J]. *Acta Neuropsychiatr*, 2018, 30(1): 1-16.
- [24] Hughes M M, Connor T J, Harkin A. Stress-related immune markers in depression: Implications for treatment [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2016, 19(6): pyw001.
- [25] Lee S M, Kim E J, Suk K, *et al.* CD300F blocks both MyD88 and TRIF-mediated TLR signaling through activation of Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 [J]. *J Immunol*, 2011, 186(11): 6296-6303.
- [26] Ali-Ruiz D, Vituriera N, Peluffo H. Microglial CD300f immune receptor contributes to the maintenance of neuron viability *in vitro* and after a penetrating brain injury [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 16796.

[责任编辑 李亚楠]