

整合脑组织代谢组学和肠道菌群测序分析研究酸枣仁汤抗抑郁的作用机制

常佳东¹, 吴 江¹, 韩 瑞², 秦雪梅¹, 杜晨晖^{2*}, 闫 艳^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 太原 030619

摘要: **目的** 整合脑组织代谢组学和肠道菌群测序分析研究酸枣仁汤 (Suanzaoren Decoction, SZRD) 抗抑郁的作用机制。**方法** 30 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、文拉法辛 (0.035 g/kg) 组和 SZRD 低、高 (12、24 g/kg) 剂量组。除对照组外, 其余各组大鼠均进行慢性不可预知温和应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 造模, 同时 ig 相应药物, 连续给药 28 d。基于超高效液相色谱-串联质谱 (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 技术进行脑组织神经递质测定。基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS) 技术进行脑组织非靶向代谢组学研究, 通过多元统计对代谢轮廓进行分析, 以变量重要性投影值 (variable importance in projection, VIP) > 1、 $P < 0.05$ 筛选差异代谢物, 并通过 MetaboAnalyst 进行通路分析。采用肠道菌群测序 (16S ribosomal RNA, 16S rRNA) 技术对肠道菌群进行结构表征, 并用气相色谱-质谱联用技术 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 对短链脂肪酸含量进行测定。将差异菌群的相对丰度, 短链脂肪酸含量和差异代谢物的相对含量与行为学结果进行 Spearman 分析。**结果** SZRD 可显著升高脑中的 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 和谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 的含量 ($P < 0.01$)。脑代谢组学结果显示, 与对照组比较, 模型组中共鉴定到 43 个差异代谢物, 其中 8 个脂肪酸和 3 个氨基酸相对含量显著降低 ($P < 0.05$), 4 个磷脂酰胆碱, 4 个磷脂酰乙醇胺和 1 个鞘脂相对含量显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, SZRD 低、高 (12、24 g/kg) 剂量组分别能显著回调 15、11 个差异代谢物 ($P < 0.05$), 共同显著回调了 10 个差异代谢物 ($P < 0.05$), 且共同作用于苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢和三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA) 3 条代谢通路。同时, SZRD 可显著升高乳酸杆菌和粪球菌的丰度 ($P < 0.05$) 并显著增加丙酸, 乙酸和丁酸的含量 ($P < 0.05$)。Spearman 分析表明, 乳酸杆菌等差异菌的丰度及乙酸、丁酸、丙酸的含量与抑郁行为密切相关, 差异代谢物的相对丰度与抑郁行为也显著相关。**结论** SZRD 发挥抗抑郁作用机制可能与回调乳酸杆菌、粪球菌、乙酸、丙酸、丁酸及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等通路有关。

关键词: 酸枣仁汤; 抑郁症; 脑代谢组学; 肠道菌群; 短链脂肪酸; 斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、乌药碱、阿魏酸、知母皂苷 B II
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)03-0905-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.03.017

Study on anti-depression mechanism of Suanzaoren Decoction by integrated brain metabolomics and gut microbiota sequencing analysis

CHANG Jiadong¹, WU Jiang¹, HAN Rui², QIN Xuemei¹, DU Chenhui², YAN Yan¹

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

2. School of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China

Abstract: **Objective** To investigate the anti-depression mechanism of Suanzaoren Decoction (酸枣仁汤, SZRD) by integrated brain metabolomics and gut microbiota sequencing analysis. **Methods** A total of 30 male SD rats were randomly divided into control

收稿日期: 2024-10-23

基金项目: 山西省科学技术厅-地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室项目 (201605D111004); 山西省科学技术厅山西省科技创新人才团队项目 (202304051001020); 山西省科技成果转化引导专项计划项目 (202204021301063); 山西省科学技术厅中央引导地方科技发展资金项目 (YDZJSX2021C025); 山西中医药大学科技创新团队项目 (2022TD2009); 山西中医药大学 2024 年科技创新能力培育计划项目 (2024PY-JL-11-01, 2024PY-JL-11-02)

作者简介: 常佳东, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制及中药分析。E-mail: 1120873335@qq.com

***通信作者:** 闫 艳, 副教授, 博士, 研究方向为中药质量控制及中药体内过程分析。E-mail: yanyan520@sxu.edu.cn

杜晨晖, 教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: dch@sxtcm.edu.cn

group, model group, venlafaxine (0.035 g/kg) group, SZRD low- and high-dose groups (12, 24 g/kg). Except control group, chronic unpredictable mild stress (CUMS) modeling was performed and drugs were ig administered for 28 d. Determination of neurotransmitters in brain tissue based on ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) technique was conducted. Non-targeted metabolomic study of brain tissue was conducted based on ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) technology, metabolic profile was analyzed by multivariate statistics, differential metabolites were screened by variable importance in projection (VIP) > 1 and $P < 0.05$, and pathway analysis was performed by MetaboAnalyst. The gut microbiota was characterized by 16S ribosomal RNA (16S rRNA) and the content of short-chain fatty acids was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The relative abundance, short-chain fatty acid content, and metabolite content of different bacteria were compared with behavioral results by Spearman analysis. **Results** SZRD could significantly increase the content of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and glutamic acid (Glu) in brain ($P < 0.01$). Brain metabolomics results showed that compared with control group, a total of 43 differential metabolites were identified in model group, specifically, the relative contents of eight fatty acids and three amino acids were significantly reduced ($P < 0.05$), and the relative contents of four phosphatidylcholine, four phosphatidylethanolamine and one sphingolipid were significantly increased ($P < 0.05$). SZRD low- and high-dose groups could significantly reduce 15 and 11 differential metabolites ($P < 0.05$), respectively. All of them significantly reversed ten different metabolites ($P < 0.05$), and together acted on three pathways of phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, alanine, aspartate and glutamate metabolism and tricarboxylic acid cycle (TCA). At the same time, SZRD could significantly increase the abundance of lactobacillus and faecalis ($P < 0.05$) and significantly increase the contents of propionic acid, acetic acid and butyric acid ($P < 0.05$). Spearman analysis showed that the abundance of *Lactobacillus* and other differential bacteria and the contents of acetic acid, butyric acid and propionic acid were closely correlated with depressive behavior, and the relative abundance of differential metabolites was also significantly correlated with depressive behavior. **Conclusion** SZRD can exert antidepressant effect. The mechanism of the antidepressant effect may be related to the regulation of lactobacillus, fecal bacteria, acetic acid, propionic acid, butyric acid, alanine, aspartate and glutamate metabolism pathway.

Key words: Suanzaoren Decoction; depression; brain metabolomics; gut microbiota; short chain fatty acids; spinosyn; jujuboside A; coclaurine; ferulic acid; timosaponin B II

抑郁症是全球最常见的精神障碍之一，以显著且持久的情绪低落、厌食、自残甚至自杀等为主要临床表现，平均终生患病率为 11%~15%^[1]。2022 版心理健康蓝皮书《中国国民心理健康发展报告（2021—2022）》报告^[2]中指出抑郁症的发生已呈现年轻化与普遍化。目前，临床上治疗抑郁症以心理疗法和药物治疗为主，传统药物有单胺氧化酶抑制剂及三环类抗抑郁药和 5-羟色胺（5-hydroxytryptamine, 5-HT）再摄取抑制剂，但其存在起效慢、不良反应多、效果不佳等缺点^[3]。中药方剂因其多成分、多靶点、多途径的作用特点，在治疗抑郁症中具有独特的优势。

酸枣仁汤出自张仲景《金匱要略》，由酸枣仁（15 g）、知母（6 g）、茯苓（6 g）、川芎（6 g）、甘草（3 g）组成，为治疗肝血不足不寐的代表方剂。酸枣仁汤临床经典用途为治疗失眠症。现代临床研究表明，酸枣仁汤及其加减方在治疗失眠伴焦虑、抑郁和产后抑郁方面疗效显著，能达到与帕罗西汀相同的治疗效果，且不良反应少^[4]。王芳等^[5]研究表明酸枣仁汤与文拉法辛联合使用对抑郁症伴失眠

疗效显著；归脾汤合酸枣仁汤可明显改善患者抑郁程度^[6]；且甘麦大枣汤合酸枣仁汤加减治疗对肝郁脾虚型抑郁症有独特疗效^[7]。上述研究结果表明，酸枣仁汤在临床上广泛用于抑郁症的治疗，能有效改善抑郁症患者情绪低落和失眠等症状。酸枣仁汤临床新用途的发现不仅充分体现了中医学“辨证施治”和“异病同治”的优势与特色，同时对于提升其临床地位以及丰富抑郁症的治疗手段也具有重要意义。现代药理研究表明，酸枣仁汤可显著增加慢性不可预知温和应激（chronic unpredictable mild stress, CUMS）抑郁模型大鼠糖水消耗量和自主活动，并降低大脑皮质星形胶质细胞表达，其作用机制可能与促进海马钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II（calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII）基因表达从而减少神经元细胞凋亡有关^[8]；其可通过调节 CUMS 抑郁小鼠大脑和肠道中 Toll 样受体 4（Toll-like receptor 4, TLR4）/核因子 κ B（nuclear factor kappa-B, NF- κ B）/核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白 3（nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein3 ,

NLRP3) 免疫通路发挥抗抑郁作用^[9]。另有研究表明, 酸枣仁汤可通过增加脑内单胺类神经递质含量从而显著改善 CUMS 大鼠兴趣丧失、活动能力下降等抑郁症状^[10]。课题组前期研究表明, 酸枣仁汤可影响色氨酸、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路发挥抗抑郁样作用^[11]; 网络药理学研究表明其主要通过介导血清素受体和多巴胺受体等调节机体神经系统和内分泌系统信号传导, 对脑内神经递质进行调节, 发挥抗抑郁作用^[12]。然而, 酸枣仁汤抗抑郁的作用机制有待进一步阐明。研究表明, 大脑对神经递质和肠道对微生物等的调节在抑郁症发生过程起到重要作用^[13]。研究表明, 抑郁症患者粪便中拟杆菌门/厚壁菌门比值显著增加, 并发现拟杆菌属的富集和经黏液真杆菌属、粪杆菌属、粪球菌属耗竭^[14]。据此, 本研究拟采用肠道菌群测序 (16S ribosomal RNA, 16S rRNA) 技术进行盲肠内容物菌群结构分析, 并采用气相色谱-质谱联用技术 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 技术测定短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs) 含量; 进而采用液质联用技术结合多元统计分析进行大鼠脑组织非靶向代谢组学研究, 旨在阐明酸枣仁汤发挥抗抑郁的作用途径, 为扩大酸枣仁汤的临床应用提供实验数据。

1 材料

1.1 动物

健康雄性无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 (Sprague-Dawley, SD) 大鼠, 体质量 200~220 g, 6~8 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2021-0011。饲养于温度 (24±1) °C、湿度 (55±5) %、光照/黑暗周期 12 h/12 h 的环境, 实验期间动物保持自由饮水和进食。动物实验经山西大学动物伦理委员会批准 (批准号 SXULL2020028)。

1.2 药品与试剂

酸枣仁 (批号 201909) 购自河北省安国市嘉润中药材有限公司; 茯苓 (批号 200501) 购自亳州市京皖中药饮片厂; 知母 (批号 2020110451) 购自安徽盛海堂中药饮片有限公司; 川芎 (批号 200713005) 购自北京仟草中药饮片有限公司; 甘草 (批号 201202) 购自亳州市京皖中药饮片厂。以上药材均经山西中医药大学中药鉴定教研室杜晨晖教授鉴定, 酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujube* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的成熟干

燥种子; 茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf. 的干燥菌核; 知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎; 川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎; 甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。

文拉法辛 (批号 200104, 国药准字 H20084497) 购自苏州第四制药厂有限公司; 质谱级甲酸 (批号 64-18-6)、乙腈 (批号 75-05-8) 均购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 乙酸 (批号 RH500027,) 购自上海易恩化学技术有限公司; 丙酸 (批号 P0500)、丁酸 (批号 B0754)、2-乙基丁酸 (批号 E0070) 均购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司; 3,4-二羟基苄胺氢溴酸盐 (3,4-dihydroxybenzylamine hydrobromide, DHBA, 批号 D167718)、5-HT (批号 J2123590)、谷氨酸 (glutamate, Glu, 批号 J2128546) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.3 仪器

Agilent 1290 Infinity II 型超高效液相色谱系统 (美国 Agilent 公司); 3200 QTRAP 型三重四极杆串联质谱仪、5600⁺Q-TOF 型高分辨质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); TV1603N21312 型全自动氮吹浓缩仪 (英国 Biotage 公司); CPA225D 型 1/10 万电子天平 (德国 Sartorius 公司); Milli-Q 型超纯水系统 (美国 Millipore 公司); Neofuge 13R 型高速冷冻离心机 (上海申力科学仪器有限公司); DHFSTPRP-24 型组织研磨仪 (宁波洛尚智能科技有限公司); 7890B-5977B 型气相色谱-质谱联用仪 (美国安捷伦科技公司); H1650 型台式高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

2 方法

2.1 酸枣仁汤制备

参照《方剂学》第 5 版^[15], 按照酸枣仁、知母、茯苓、川芎、甘草 18:10:10:5:3 称, 加 10 倍量水, 浸泡 30 min, 武火煎煮至沸, 换文火煎煮保持微沸 30 min, 8 层纱布趁热滤过。药渣加 8 倍量水, 文火微沸 20 min, 8 层纱布滤过, 合并 2 次滤液, 减压浓缩至 2.4 g/mL (生药量)。经 HPLC 含量测定结果显示, 斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、乌药碱、阿魏酸、知母皂苷 B II 质量分数分别为 0.836、0.575、0.195、1.083、21.390 mg/g。

2.2 动物分组、造模、给药及行为学评价

将 30 只大鼠随机分为对照组、模型组、文拉法辛 (0.035 g/kg) 组和酸枣仁汤低、高剂量 (12、24 g/kg) 组, 每组 6 只。CUMS 抑郁大鼠模型的构建参考文献方法^[16], 各组大鼠单独饲养, 每天随机选择一种应激方式, 同一种刺激累计使用不超过 4 次, 包括 50 °C 热刺激 10 min、4 °C 冰水浴 5 min、60 Hz 超声 3 h、夹尾 2 min、昼夜颠倒 24 h、足底电击 10 次 (每次 10 s)、禁水 24 h、束缚 3 h 和禁食 24 h 等, 避免重复, 持续 4 周。对照组大鼠正常摄食饮水, 不给予任何刺激, 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组大鼠 ig 等量生理盐水, 1 次/d, 连续给药 31 d。末次给药后, 称量体质量, 进行行为学评价: 将大鼠置于旷场箱内, 记录大鼠 4 min 内旷场穿越格数、直立次数; 将大鼠置于玻璃容器中, 适应 2 min 后记录大鼠 4 min 强迫游泳不动时间; 将大鼠禁食禁水 12 h 后测定 4 h 内糖水消耗量^[10]。

2.3 样本采集

于末次给药前 1 d, 所有大鼠禁食不禁水, 大鼠 ip 戊巴比妥钠, 腹主动脉取血, 静置 1 h, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 取血清, 于 -80 °C 保存。在冰上迅速取出脑组织及盲肠内容物, 生理盐水清洗、擦干, 置于冻存管, 于 -80 °C 备用。

2.4 大鼠脑神经递质水平测定

2.4.1 对照品溶液制备 取各对照品适量, 精密称定, 加入空白溶液 (0.2% 甲酸水-甲醇 8:2) 溶解, 分别制成含 450 μg/mL 5-HT、20 μg/mL Glu 和 720 μg/mL DHBA 的母液。

2.4.2 样品制备 取 0.1 g 脑组织, 加入 1 mL 乙腈, 匀浆后, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min, 取上清 800 μL 于 EP 管内, 加入 50 μL 质量浓度为 36 μg/mL 的 DHBA 溶液, 再加入 50 μL 空白溶液, 氮气吹干后, 用 100 μL 初始流动相 (0.2% 甲酸水-乙腈 98:2) 复溶, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 待测。

2.4.3 色谱与质谱条件

(1) 色谱条件: 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 柱温 30 °C, 以 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0~2.5 min, 5% B; 2.5~4.0 min, 5%~20% B; 4.0~7.0 min, 20%~60% B; 7.0~7.5 min, 60%~5% B; 7.5~10.0 min, 5% B; 体积流量 0.2 mL/min, 进样体积 3 μL。

(2) 质谱条件: 电喷雾离子源 (Dual AJS ESI); 正离子模式; 多反应监测模式 (MRM); 气帘气 40 psi (1 psi=6.895 kPa); 碰撞气体 N₂; 喷雾电压 5 500 V; 离子源温度 500 °C; 气体流速 12 L/min。

2.4.4 标准曲线绘制 分别取单一对照品母液, 配制含 5-HT 和 Glu 质量浓度分别为 1.8 μg/mL 和 3.6 μg/mL 的混合对照品溶液, 并逐级稀释。按“2.4.2”项下方法处理空白基质, 并将稀释后的混合对照品溶液加入空白基质中。按“2.4.3”项下色谱与质谱条件进样检测。5-HT 线性回归方程 $Y=0.0143X-0.0127$, $r=0.9975$; Glu 线性回归方程 $Y=4\times10^{-5}X+0.1588$, $r=0.9992$ 。

2.5 脑组织代谢组学分析

2.5.1 样本预处理 取 20 mg 脑组织, 置于 1.5 mL EP 管, 加入 0.2 mL 预冷甲醇, 匀浆, 涡旋, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min。取上清, 氮气吹干, 加入 100 μL 甲醇复溶, 涡旋, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 待测。将已制备的每个样本取 20 μL 混合获得质控 (quality control, QC) 样本。分析前, 插入 6 针 QC 样品; 分析中, 每 6 个样本穿插 1 针 QC 样本, 以评价分析过程的稳定性和重复性。

2.5.2 色谱与质谱条件

(1) 色谱条件: 采用 Agilent 1290 Infinity II 超高效液相色谱系统和 Waters ACQUITY UPLC® HSS T3 柱 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 柱温 50 °C, 以 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0~1 min, 2% B; 1~3 min, 2%~50% B; 3~14 min, 50%~60% B; 14~18 min, 60%~90% B; 18~19 min, 90%~100% B; 19~20 min, 100% B, 体积流量 0.35 mL/min, 进样体积 5 μL。

(2) 质谱条件: 电喷雾离子源 (Dual AJS ESI), 正/负离子模式, 毛细管电压 (Vcap) 正离子 5 500 V、负离子 4 500 V, 离子源温度 450 °C; 辅助气为氮气; 气帘气、雾化气及辅助气的压力分别为 30、55、55 psi 去簇电压 60 V; 碰撞能量 35 eV。一级质荷比检测范围 m/z 100~1 500, 模式选择数据依赖性采集; 选择响应值超过 100 cps 的 10 个最高峰进行二级质谱扫描, Product Ion 扫描范围 m/z 50~1 500, 并开启动态背景扣除以减少干扰。

2.5.3 数据预处理及分析 将格式为 .wiff 及 wiff.scan 的 LC-MS/MS 原始数据文件采用 Analysis Base File Converter 软件转化成 .abf 格式文件; 利

用 MS-DIAL 4.60 软件进行色谱峰对齐以及归一化预处理。采用 QC 进行数据质量评价,以 $RSD \leq 30\%$ 的变量导入 SIMCA-P 14.1 软件进行多元统计分析,包括偏最小二乘法判别分析 (partial least squares discriminant Analysis, PLS-DA) 及正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。根据 $VIP > 1$ 、 $P < 0.05$ 筛选差异代谢物。采用大连达硕代谢组学数据分析智慧云平台 (One-step metabolomics: A smart cloud platform for metabolites identification and biomarkers discovery, ONE-MAP) 和人类代谢组数据库 (human metabolome database, HMDB) 进行差异代谢物的鉴别。采用 MetaboAnalyst 5.0 进行代谢通路分析。

2.6 肠道菌群测序分析

将收集的盲肠内容物样品交由上海派森诺生物科技有限公司,进行高通量测序,测序的数据按照 97% 相似度下将优质序列进行聚类,获得操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。各样本在分类水平上的组成分布进行可视化,并以柱状图呈现分析结果,利用 Prism 找到组间丰度差异的物种,利用 PICRUST2 预测肠道菌群代谢通路。

2.7 短链脂肪酸测定

2.7.1 对照品溶液制备 分别称取乙酸、丙酸和丁酸对照品适量,制成质量浓度为 12.58、2.38、2.89 mg/mL 的单一对照品溶液,并制成含有乙酸、丙酸和丁酸对照品质量浓度为 1.05、0.20、0.24 mg/mL 的混合对照品溶液,并逐级稀释。内标 2-乙基丁酸的浓度为 4.6 mg/mL。

2.7.2 样本预处理 称取 50 mg 冻干的盲肠内容物样本,加入 250 μ L 的纯水,涡旋 3 min,用 10% 的 H_2SO_4 (0.1 mol/L) 调节 pH 至 2,充分涡旋混匀,放置 10 min,加入 1 235 μ L 甲醇-水 (3:1) 溶液涡旋 1 min,13 000 r/min 离心 10 min,取上清 1.1 mL 加入 100 μ L 纯甲醇和 6 μ L 的 2-乙基丁酸 (内标),充分涡旋混匀,经 0.22 μ m 滤膜滤过,取续滤液,待测。

2.7.3 GC-MS 分析

(1) 气相色谱条件:采用 DB-FFAP 毛细管柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 m),载气为氦气,体积流量为 1 mL/min,采用压力脉冲分流模式 (10 psi),进样体积 0.5 μ L,分流比为 10:1。采用程序升温,

起始温度为 100 $^{\circ}C$,100 $^{\circ}C$ 开始,以 15 $^{\circ}C$ /min 升到 110 $^{\circ}C$,再以 5 $^{\circ}C$ /min 升到 120 $^{\circ}C$ 保持 1 min,以 10 $^{\circ}C$ /min 升到 130 $^{\circ}C$,以 3 $^{\circ}C$ /min 升到 140 $^{\circ}C$ 保持 1 min,再以 30 $^{\circ}C$ /min 升到 220 $^{\circ}C$ 。

(2) 质谱条件:EI 电离 70 eV,离子源温度 230 $^{\circ}C$,四级杆温度 150 $^{\circ}C$,溶剂延迟 3 min, SIM 模式扫描。使用 Mass Hunter 定量分析软件进行自动积分。

2.8 统计学分析

数据采用 SPSS22.0 统计软件进行分析处理。所有呈正态分布的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 8.1 进行作图分析,两组之间比较使用 t 检验,多组间比较使用 One-way ANOVA 分析,使用在线网站 (<https://www.chiplot.online/>) 进行 Pearson 相关性分析。

3 结果

3.1 行为学评价

如图 1 所示,与对照组比较,模型组大鼠体质量、穿越格数、直立次数和糖水偏爱率均显著降低 ($P < 0.001$),强迫游泳不动时间显著增加 ($P < 0.001$);与模型组比较,给与 SZRD 后可显著增加大鼠的体质量、穿越格数、直立次数和糖水偏爱率 ($P < 0.01$),极显著降低强迫游泳不动时间 ($P < 0.001$)。

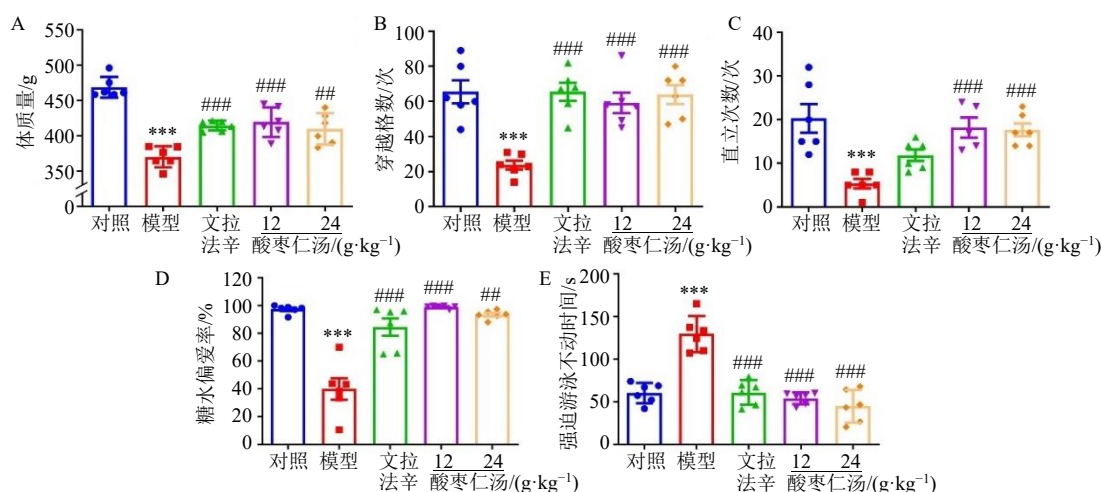
3.2 大鼠脑神经递质水平测定

如图 2 所示,与对照组比较,模型组 5-HT 和 Glu 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001);与模型组比较,酸枣仁汤低剂量组和文拉法辛组 5-HT 和 Glu 水平显著增加 ($P < 0.01$),酸枣仁汤高剂量组 Glu 水平显著增加 ($P < 0.001$)。

3.3 脑组织代谢组学

3.3.1 QC 评价 如图 3-A、B 所示,在正、负离子模式下,QC 样本的变化均在 2 个标准差范围内,所有 QC 样品均在 95% 置信区间内,表明仪器稳定,检测系统可靠,所得差异物能反映样本间的生物学差异。

3.3.2 代谢轮廓分析 如图 4-A、B 所示,在正、负离子模式下,PLS-DA 模型显示对照组与模型组均明显分开,说明模型组大鼠代谢轮廓显著紊乱,各给药组均位于对照组与模型组中间,酸枣仁汤低剂量组和文拉法辛组趋向于对照组。为进一步寻找模型扰动下的差异代谢物及给药后的回调趋势,进行了对照组与模型组的 OPLS-DA 分析 (图 4-C、D),正离子下模型参数 $R^2_X = 0.64$ 、 $R^2_Y = 1$ 、 $Q^2 = 0.931$,负离



A-体质量; B-穿越格数; C-直立次数; D-糖水偏爱率; E-强迫游泳不动时间; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下图同。

A-body weight; B-number of traverses; C-number of uprights; D-sugar water preference rate; E-forced swimming motionless time; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 酸枣仁汤抗抑郁药效学评价 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Evaluation of antidepressant pharmacodynamics of Suanzaoren Decoction ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

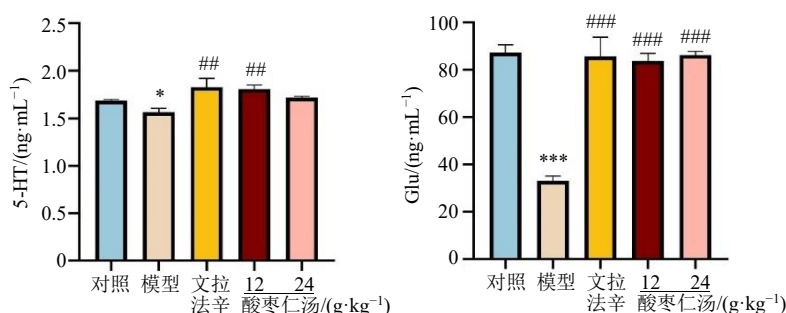


图 2 酸枣仁汤对 5-HT 和 Glu 的含量影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of Suanzaoren Decoction on content of 5-HT and Glu ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

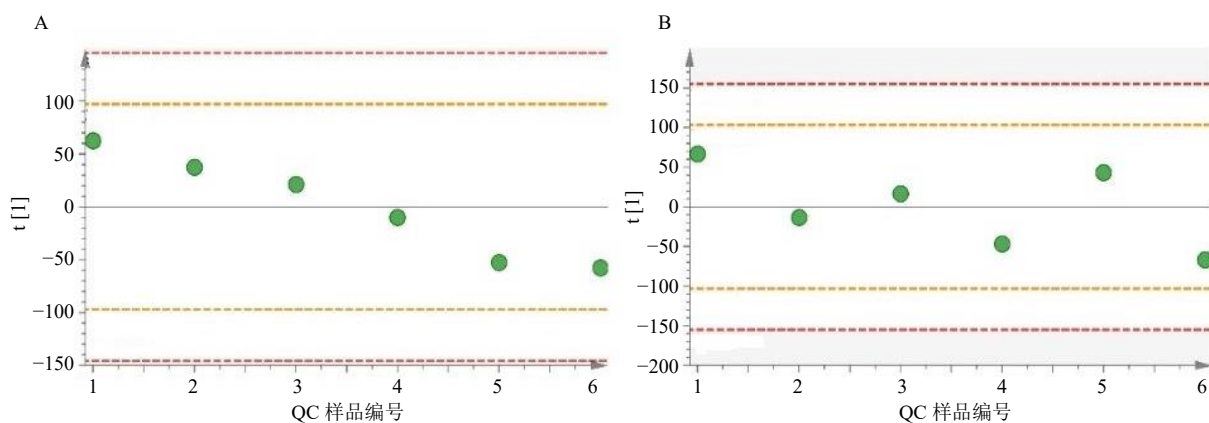


图 3 正 (A) 和负离子 (B) 模式下 QC 评价

Fig. 3 QC evaluation under positive ion (A) and negative ion (B) modes

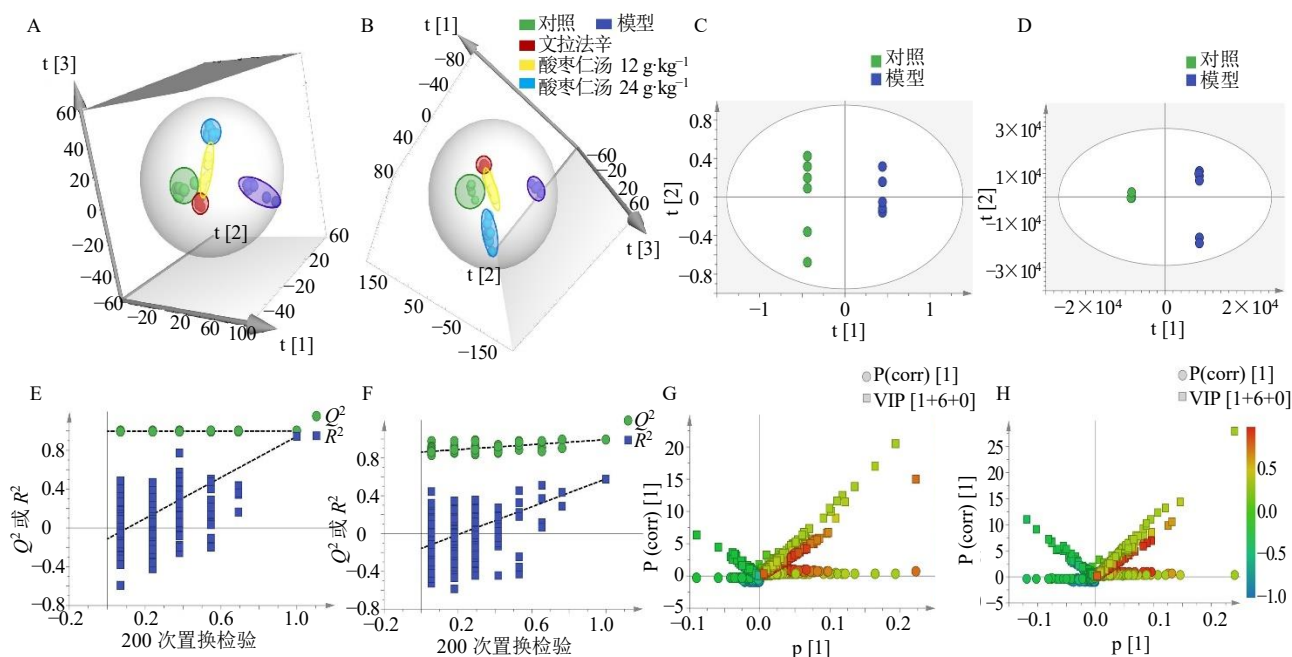


图 4 各组正、负离子模式下 PLS-DA 得分图 (A, B)、OPLS-DA 得分图 (C, D)、200 次置换检验图 (E, F) 及 VIP-S-plot 图 (G, H)

Fig. 4 PLS-DA score plot (A, B), OPLS-DA score plot (C, D), 200 displacement test (E, F) and VIP-S-plot (G, H) of rat brain tissue samples

子模式下模型参数为 $R^2_X=0.319$ 、 $R^2_Y=0.914$ 、 $Q^2=0.582$ 。 R^2_Y 、 Q^2 均接近 1，表明模型具有较高的解释率及预测率。200 次模型验证结果（图 4-E、F）表明，左边的 R^2 和 Q^2 均低于右边， Q^2 的回归线与纵轴相交于原点以下，表明未产生过拟合，模型可靠。结合 S-plot 图（图 4-G、H），以 $VIP>1$ 和 t 检验 $P<0.05$ 为标准筛选潜在差异代谢物，共鉴定了 43 个化合物，包括 8 个脂肪酸类、3 个氨基酸类、4 个有机酸类、8 个磷脂酰胆碱类、9 个磷脂酰乙醇胺类、4 个磷脂酰肌醇类、2 个鞘脂类和 5 个其他类。如表 1 所示，与对照组比较，模型组中脂肪酸类（棕榈酸、异油酸、花生四烯酸等）和氨基酸类（酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺）相对含量显著降低（ $P<0.05$ ）；磷脂酰胆碱类、磷脂酰乙醇胺类和鞘脂类相对含量显著升高（ $P<0.05$ ）。文拉法辛组、酸枣仁汤低、高剂量组分别能显著回调 8、15、11 个差异代谢物（ $P<0.05$ ）。

3.3.3 代谢通路分析 如图 5 所示，与对照组比较，模型组显著影响苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成，丙氨酸、天冬氨酸和 Glu 代谢，酪氨酸代谢，TCA 循环，鞘脂代谢和醚脂代谢。文拉法辛、高剂量酸枣仁汤均可作用于以上苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成，丙氨酸、天冬氨酸和 Glu 代谢，酪氨酸代谢，TCA 循环 4 条代谢通路，而低剂量酸枣仁汤仅回调了苯丙氨酸通路、酪氨酸和色氨酸生物合成通路、丙氨酸通路、天冬氨酸和 Glu 代谢和 TCA 循环代谢通路。低、高剂量酸枣仁汤均回调了苯丙氨酸通路、酪氨酸和色氨酸生物合成、丙氨酸通路、天冬氨酸和 Glu 代谢和 TCA 循环。

氨酸代谢，TCA 循环 4 条代谢通路，而低剂量酸枣仁汤仅回调了苯丙氨酸通路、酪氨酸和色氨酸生物合成通路、丙氨酸通路、天冬氨酸和 Glu 代谢和 TCA 循环代谢通路。低、高剂量酸枣仁汤均回调了苯丙氨酸通路、酪氨酸和色氨酸生物合成、丙氨酸通路、天冬氨酸和 Glu 代谢和 TCA 循环。

3.4 对 CUMS 抑郁大鼠肠道菌群群落结构的影响

3.4.1 肠道菌群 α 与 β 多样性分析 Venn 图可反映各组之间共有和独有的 OTU 数目及样本群落组成相似度。如图 6-A 所示，对照组、模型组、文拉法辛组、酸枣仁汤低、高剂量组共有 OTU 253 个，各组分别特有 OTU 为 7 683、9 076、8 904、5 373、4 995 个。如图 6-B 所示，稀疏曲线显示所有组别物种等级-丰度分布曲线趋近平滑，所有样本物种分布较为均匀。 α 多样性反映个体内不同微生物群落之间的多样性。与对照组比较，模型组肠道菌群 Observed species、Shannon 和 Simpson 指数均降低，但无显著性差异（图 6-C）。 β 多样性主坐标分析（principal co-ordinates analysis, PCoA）反映样本组间差异。图 6-D 显示对照组与模型组之间明显分离，表明造模后大鼠肠道菌群发生了紊乱。酸枣仁汤低、高剂量组较文拉法辛组更接近对照组，说明酸

表 1 脑组织代谢组学差异代谢物

Table 1 Metabolomic differential metabolites of brain tissue

序号	离子模式	代谢物	tr/min	m/z	分子式	模型 vs 对照	文拉 法辛 vs 模型	低剂量 vs 模型	高剂量 vs 模型
1	正离子	肌酸	1.245	132.076 8	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	↓***	↓	↓	↓
2	正离子	次黄嘌呤	1.897	137.045 4	C ₅ H ₄ N ₄ O	↓***	↓	↓	↓
3	正离子	酪氨酸	2.501	182.080 6	C ₉ H ₁₁ NO ₃	↑***	↓###	↓###	↓###
4	正离子	鞘氨醇	9.562	302.303 8	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	↓***	↑	↓	↓
5	正离子	MG (16:0/0:0/0:0)	12.859	313.274 9	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	↑*	↓	↓	↓
6	正离子	植物鞘氨醇	7.161	318.299 1	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	↑*	↓	↓	↑
7	正离子	O-棕榈酰肉碱	17.614	400.340 5	C ₂₃ H ₄₅ NO ₄	↑**	↓	↓#	↓
8	正离子	LysoPE (0:0/16:0)	13.828	454.289 9	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	↓**	↓	↑	↑
9	正离子	LysoPE [18:1(9Z)/0:0]	14.750	480.305 0	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	↑*	↑	↑	↑
10	正离子	LysoPE (18:0/0:0)	17.833	482.320 0	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	↓*	↓	↓	↓
11	正离子	LysoPC (16:0/0:0)	12.968	496.338 8	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	↑*	↑	↑	↑
12	正离子	LysoPC (17:0/0:0)	16.469	510.353 7	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	↓***	↓	↓	↓
13	正离子	LysoPC (18:2/0:0)	12.129	520.337 4	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	↓***	↓	↓	↓
14	正离子	LysoPC (18:1/0:0)	15.549	522.352 8	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	↓***	↓	↓	↓
15	正离子	LysoPC (18:0/0:0)	18.082	524.367 6	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	↑***	↑	↑	↑
16	正离子	PC [18:1(9Z)/16:0]	21.903	760.582 4	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	↓**	↑	↓	↓
17	正离子	PC [18:1(9Z)/18:0]	16.489	788.618 7	C ₄₄ H ₈₆ NO ₈ P	↑*	↓	↓	↓
18	负离子	反丁烯二酸	1.299	115.004 2	C ₄ H ₄ O ₄	↓***	↑##	↑##	↑#
19	负离子	天冬氨酸	1.186	132.031 4	C ₄ H ₇ NO ₄	↓*	↑	↑#	↑#
20	负离子	苹果酸	1.314	133.013 7	C ₄ H ₆ O ₅	↓***	↑##	↑#	↑#
21	负离子	谷氨酰胺	1.178	145.062 4	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	↓*	↑	↑#	↑
22	负离子	柠檬酸	1.945	191.020 5	C ₆ H ₈ O ₇	↓***	↓	↓	↓
23	负离子	泛酸	3.392	218.103 1	C ₉ H ₁₇ NO ₅	↓**	↑	↑###	↑
24	负离子	棕榈酸	20.554	255.232 2	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	↓*	↑	↑###	↑#
25	负离子	异油酸	20.707	281.247 8	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	↓***	↑#	↑###	↑##
26	负离子	硬脂酸	21.765	283.260 4	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	↓***	↑	↓	↓
27	负离子	N-乙酰神经氨酸	1.232	308.098 4	C ₁₁ H ₁₉ NO ₉	↓***	↑#	↑#	↑###
28	负离子	花生酸	20.901	311.295 5	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	↓***	↑	↑	↓
29	负离子	肾上腺酸	20.525	331.262 1	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	↓***	↑	↑#	↑
30	负离子	二十二酸	21.263	339.326 3	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	↓***	↓	↑	↓
31	负离子	神经酸	21.291	365.343 5	C ₂₄ H ₄₆ O ₂	↓***	↓	↑#	↓
32	负离子	LysoPE (p-16:0/0:0)	16.130	436.283 9	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	↑*	↑	↓###	↓###
33	负离子	LysoPE [p-18:1(9Z)/0:0]	16.887	462.295 1	C ₂₃ H ₄₆ NO ₆ P	↓***	↑	↓	↓
34	负离子	LysoPE (p-18:0/0:0)	19.115	464.312 9	C ₂₃ H ₄₈ NO ₆ P	↓**	↑	↓	↑
35	负离子	LysoPE [20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0]	11.732	500.279 0	C ₂₅ H ₄₄ NO ₇ P	↑***	↓#	↑	↑
36	负离子	LysoPE [20:3(5Z,8Z,11Z)/0:0]	13.583	502.290 9	C ₂₅ H ₄₆ NO ₇ P	↑*	↑	↑	↑
37	负离子	LysoPE [22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0]	16.321	524.277 7	C ₂₇ H ₄₄ NO ₇ P	↓**	↑	↑	↑
38	负离子	LysoPI [18:1(9Z)/0:0]	11.384	597.307 0	C ₂₇ H ₅₁ O ₁₂ P	↑***	↓###	↓###	↓###
39	负离子	LysoPI (18:0/0:0)	15.131	599.319 5	C ₂₇ H ₅₃ O ₁₂ P	↑***	↓###	↓###	↓###
40	负离子	LysoPI [20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0]	8.437	619.289 9	C ₂₉ H ₄₉ O ₁₂ P	↑**	↓	↓	↓#
41	负离子	PG [16:1(9Z)/18:0]	21.793	747.517 8	C ₄₀ H ₇₇ O ₁₀ P	↓***	↑	↑	↑
42	负离子	PC [18:1(9Z)/15:0]	15.296	804.57 48	C ₄₁ H ₈₀ NO ₈ P	↑*	↓	↓	↓
43	负离子	PI [18:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)]	21.819	885.553 6	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₃ P	↓**	↓	↓	↓

“↑”表示上调,“↓”表示下调;与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。“↑” indicates up-regulation, “↓” indicates down-regulation; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

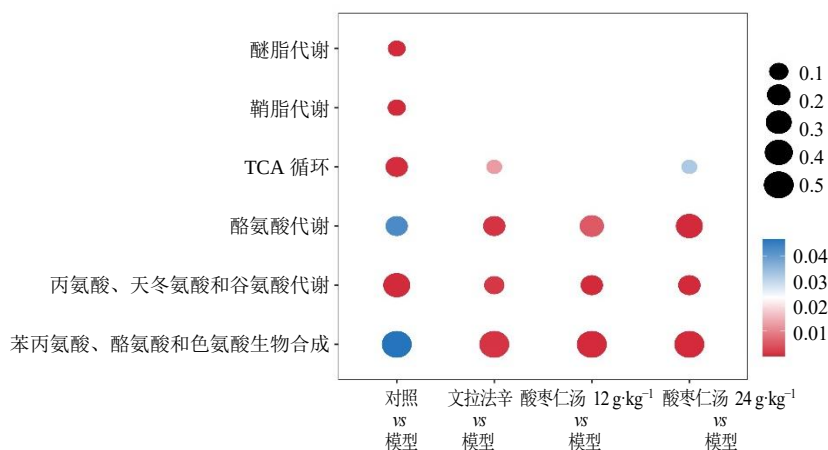
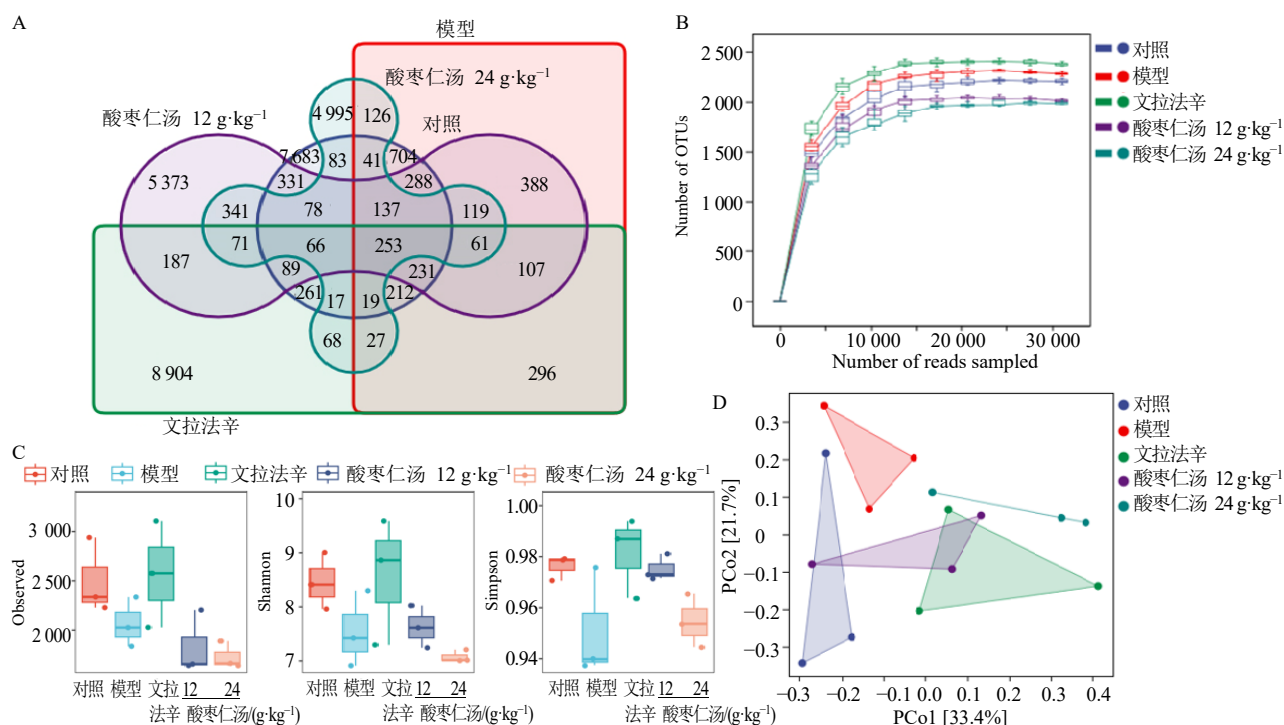


图 5 差异代谢通路图

Fig. 5 Differential metabolic pathway map



A-Venn 图；B-稀疏曲线；C- α 多样性指数；D-PCoA 分析。

A-Venn diagram; B-sparse curve; C- α diversity index; D-PCoA analysis.

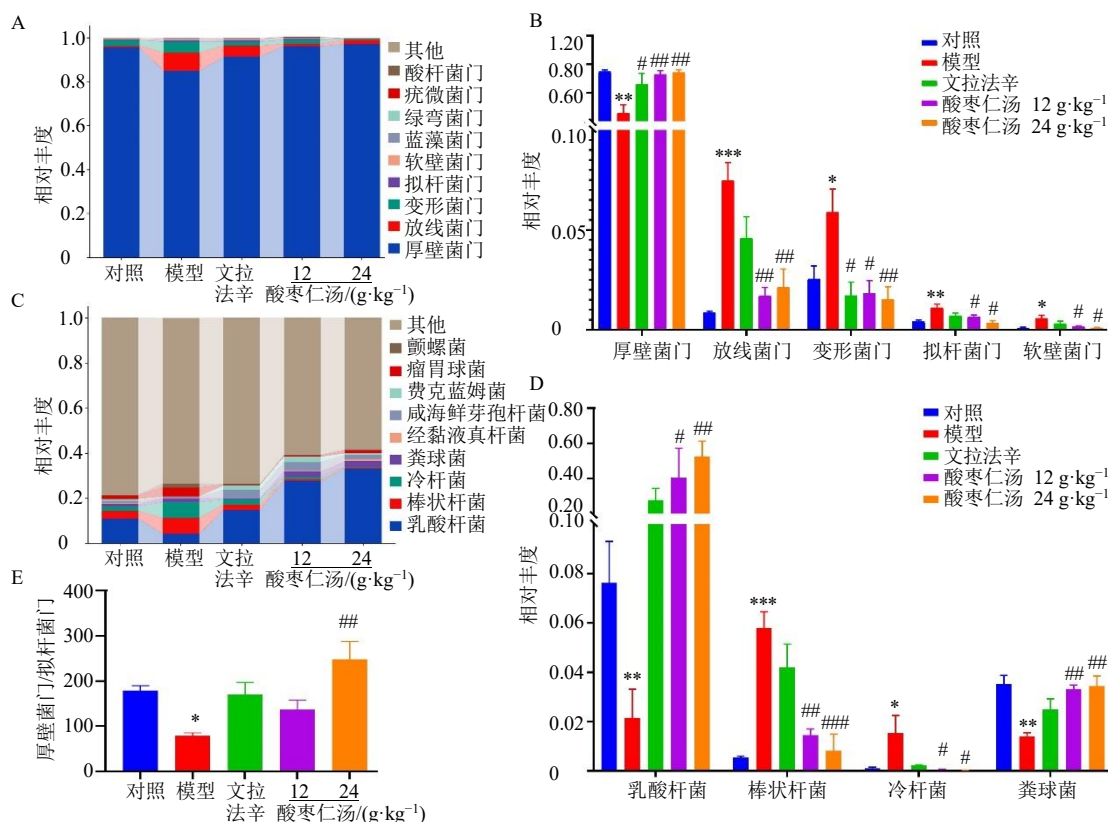
图 6 α 及 β 多样性分析

Fig. 6 Analysis of α diversity and β diversity

枣仁汤对 CUMS 大鼠肠道菌群回调作用优于文拉法辛。

3.4.2 物种组成及差异菌群分析 如图 7-A 所示，在门水平，厚壁菌门、放线菌门、变形菌门、拟杆菌门和软壁菌门相对丰度所占比例分别为 63.42%、22.46%、12.59%、0.49%和 0.29%。如图 7-B 所示，

与对照组比较，模型组中放线菌门，变形菌门和拟杆菌门相对丰度显著增加 ($P < 0.01$)，而厚壁菌门相对丰度显著降低 ($P < 0.01$)；且厚壁菌门/拟杆菌门值也显著降低 ($P < 0.05$)，见图 7-E。酸枣仁汤低、高剂量均能显著回调厚壁菌门、放线菌门、变形菌门、拟杆菌门和软壁菌门相对丰度，且酸枣仁



A、B-门水平；C、D-属水平；E-厚壁菌门/拟杆菌门。

A, B-phylum level; C, D-genus level; E-firmicutes/bacteroidetes.

图 7 肠道菌群丰度分析

Fig. 7 Analysis of gut microbiota abundance

汤高剂量可显著增加厚壁菌门/拟杆菌门值，而文拉法辛仅能回调厚壁菌门和拟杆菌门。在属水平，乳酸杆菌、棒状杆菌、冷杆菌和粪球菌为优势菌属（图 7-C）。与对照组比较，模型组乳酸杆菌和粪球菌相对丰度显著降低（ $P < 0.01$ ）；而棒状杆菌和冷杆菌相对丰度显著增加（ $P < 0.05$ 、 0.001 ）。酸枣仁汤低、高剂量均能显著回调乳酸杆菌、棒状杆菌、冷杆菌和粪球菌相对丰度，而文拉法辛对以上菌均无回调作用（图 7-D）。

3.4.3 肠道菌群代谢通路分析 生物合成代谢通路（图 8-A）的二级代谢通路主要包括氨基酸生物合成、核苷和核苷酸生物合成、脂肪酸和脂质的生物合成。代谢簇代谢通路（图 8-B）的二级代谢通路主要包括 *L*-天冬氨酸和 *L*-天冬酰胺生物合成与 *L*-谷氨酸和 *L*-谷氨酰胺生物合成。

3.5 短链脂肪酸

如表 2 所示，乙酸、丙酸和丁酸在各自的线性范围内线性关系良好， $r > 0.990$ 。如图 9 所示，与

对照组比较，模型组乙酸、丙酸、丁酸含量均显著降低（ $P < 0.01$ ），高剂量酸枣仁汤能显著增加 3 种短链脂肪酸的含量（ $P < 0.05$ ）。

3.6 相关性分析

将属水平差异菌、短链脂肪酸含量、脑差异代谢物和行为学指标进行 Pearson 相关性分析。如图 10-A 所示，强迫游泳不动时间与乳酸杆菌、粪球菌、乙酸、丙酸、丁酸呈现显著负相关（ $P < 0.05$ ）；与棒状杆菌和嗜冷杆菌呈现显著正相关（ $P < 0.05$ ； 0.05 ）。行为学指标与差异代谢物相关分析如图 10-B 所示，强迫游泳不动时间与酪氨酸成显著正相关（ $P < 0.001$ ），与富马酸、天冬氨酸、苹果酸、谷氨酰胺、柠檬酸呈显著负相关（ $P < 0.001$ ）。糖水偏爱、体质量、直立次数、穿越格数与以上结果相反。

4 讨论

课题组前期研究发现，酸枣仁汤可增加 CUMS 模型大鼠体质量，降低血清炎症因子水平；血清代谢组学研究表明，酸枣仁汤低、高剂量组均可显著回调焦谷氨酸和 *L*-色氨酸等 5 个代谢物，其可能通

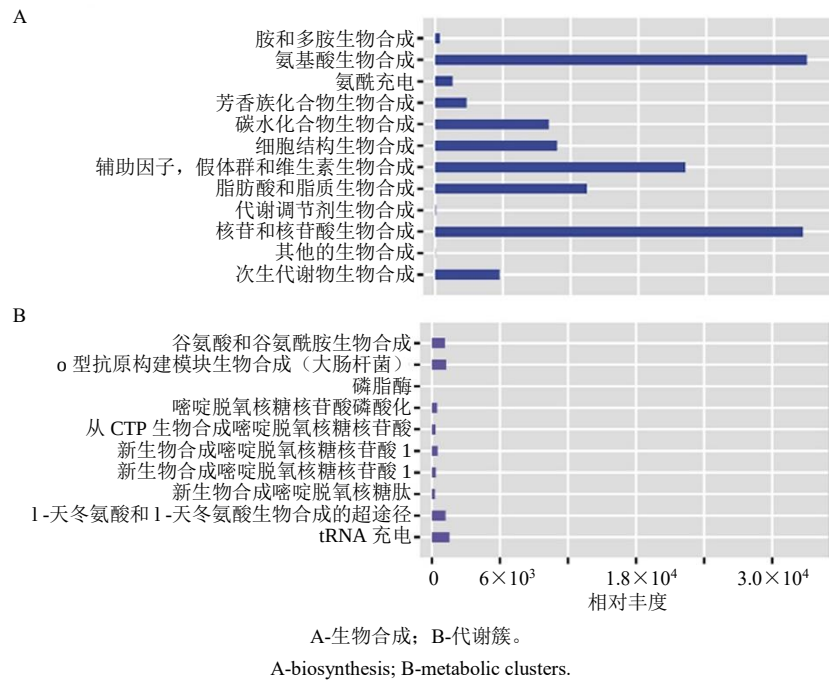


图 8 肠道菌群代谢通路预测分析
 Fig. 8 Prediction of metabolic pathways of intestinal flora

表 2 短链脂肪酸标准曲线

化学成分	回归曲线	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>	最低定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
乙酸	$Y=0.018\ 2\ X-2.132\ 0$	10.49~1 049.00	0.991 0	10.49
丙酸	$Y=0.014\ 5\ X-0.179\ 0$	1.99~198.60	0.991 6	1.99
丁酸	$Y=0.034\ 1\ X-1.071\ 9$	2.41~241.00	0.994 6	2.41

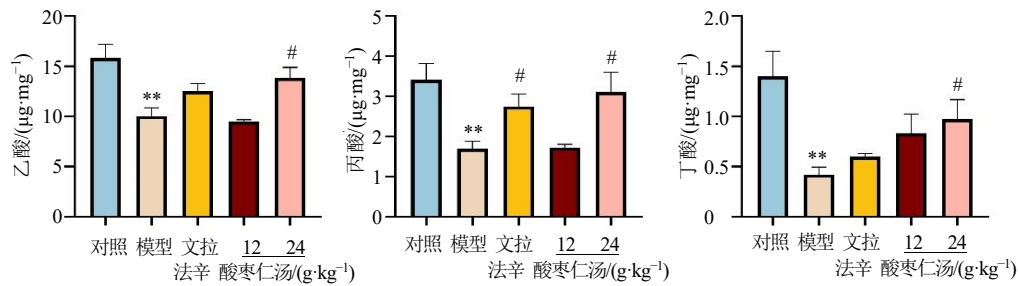
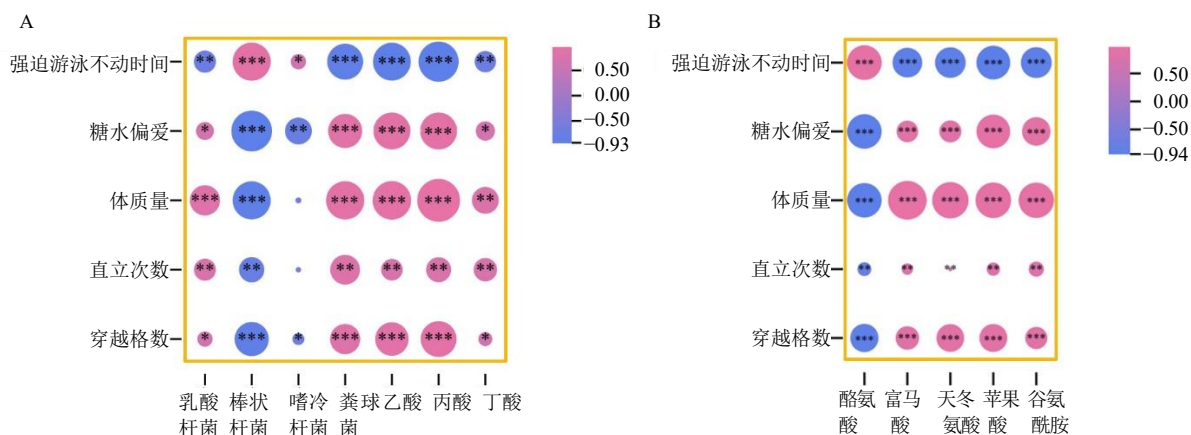


图 9 短链脂肪酸含量
 Fig. 9 Content of short-chain fatty acid

过调节色氨酸代谢以及丙氨酸、天冬氨酸和 Glu 代谢途通路发挥抗抑郁作用^[11]。天冬氨酸是大脑中重要的兴奋性氨基酸类神经递质。临床研究发现抑郁症患者血浆中天冬氨酸含量显著低于健康对照组^[17]。动物实验表明 CUMS 大鼠外周血单核细胞天冬氨酸水平降低^[18]。本研究发现，与对照组比较，模型组中天冬氨酸含量显著降低，且酸枣仁汤低、高剂

量组均可显著增加其含量。谷氨酰胺是血液中最丰富的氨基酸，是谷氨酸的前体。临床研究表明抑郁症患者血浆中谷氨酰胺水平显著低于健康对照组^[19]。已有研究表明 CUMS 小鼠血清和脑中谷氨酰胺含量显著降低^[20]。本研究发现，低剂量酸枣仁汤给药后可显著增加其含量。临床研究和动物实验均表明^[21]能量代谢紊乱是抑郁症扰动的主要



A-行为学与差异肠道菌群和短链脂肪酸; B-行为学与差异代谢物。

A-behavior and differential intestinal flora and short-chain fatty acids; B-behavior and differential metabolites.

图 10 相关性分析

Fig. 10 Correlation analysis

代谢途径。富马酸、苹果酸是 TCA 循环的中间体, 在能量代谢方面发挥了重要作用。抑郁症患者血中苹果酸和富马酸含量均显著降低^[22]。同时 CUMS 小鼠血中富马酸含量也显著降低^[23]。本研究中 CUMS 大鼠脑组织中富马酸和苹果酸含量均显著降低, 表明 CUMS 造模后, 大鼠脑中能量代谢出现紊乱。给予低、高剂量酸枣仁汤后可显著增加富马酸和苹果酸的含量。越来越多的研究证据显示肠道菌群失调与抑郁症密切相关。研究表明 CUMS 模型大鼠粪便中棒状杆菌、短杆菌、气单胞菌相对丰度显著增加; 乳酸杆菌、伯克霍尔德菌等显著减少^[24]。临床试验中发现, 乳酸杆菌是一种精神益生菌, 有助于抵抗压力, 并可缓解患者的抑郁和焦虑状态^[25]。CUMS 雄性 SD 大鼠肠道微生物组成发生改变, 且乳酸杆菌相对丰度降低^[26]。本研究中模型组大鼠盲肠内容物中乳酸杆菌和粪球菌相对丰度显著降低, 酸枣仁汤低、高剂量均可显著增加其相对丰度。棒状杆菌和冷杆菌通常被认为是有害菌。此外, 研究发现 CUMS 大鼠粪便中棒状杆菌和冷杆菌丰度显著增加^[27]。本研究发现, CUMS 大鼠盲肠内容物中棒状杆菌和冷杆菌相对丰度显著增加, 酸枣仁汤低、高剂量均可显著降低棒状杆菌和冷杆菌丰度从而调节肠道菌群结构。短链脂肪酸作为肠道菌群衍生代谢产物, 已被发现在抑郁症患者粪便肠道菌群中表现出不同程度变化^[28]。另有研究表明抑郁症患者和 CUMS 大鼠粪便中乙酸均显著降低^[29]。本研究发

现, 乙酸、丙酸、丁酸含量与抑郁样行为具有显著相关性。酸枣仁汤能增加有益菌, 减少有害菌, 同时增加短链脂肪酸的含量而发挥抗抑郁样作用。

整合肠道菌群、血清和脑组织代谢组学结果, 发现丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路是联系肠道与大脑的关键信使代谢通路。脑-肠轴是肠道与大脑之间双向的神经、内分泌和免疫通讯系统。已有研究表明, 抑郁症发病机制与脑-肠轴密切相关^[30]。酸枣仁汤能回调外周与中枢失调的天冬氨酸和谷氨酰胺水平。相关性分析表明, 天冬氨酸、谷氨酰胺与强迫游泳不动时间显著负相关。乳酸菌等肠道菌群可产生谷氨酸^[31], 谷氨酸通过谷氨酸转运体被星形胶质细胞摄取并转化为谷氨酰胺, 这种转化的改变可能会诱导抑郁症的发生^[32]。天冬氨酸是色氨酸代谢途径中的关键代谢物, 由宿主和微生物共同产生, 并作为 N-甲基-D-天冬氨酸受体激动剂参与神经递质调节^[33]。本研究中丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路上的代谢物天冬氨酸和谷氨酰胺, 在脑与肠的互动中扮演了重要的角色, 具体作用机制有待进一步的研究。

综上, 酸枣仁汤为临床治疗肝血亏虚型失眠的经典方剂。课题组前期研究表明酸枣仁汤能发挥抗抑郁样的作用。本研究一方面基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术阐释了酸枣仁汤主要通过调控脑组织苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢和 TCA 循环发挥抗抑郁作用; 另

一方面基于 16S rRNA 技术表明酸枣仁汤可通过调节肠道菌群结构与组成,通过增加乳酸杆菌和粪球菌,减少棒状杆菌和冷杆菌相对丰度,并增加丙酸,乙酸和丁酸含量而发挥抗抑郁作用。本研究对于提升酸枣仁汤临床地位以及丰富抑郁症的治疗手段具有重要意义,并为酸枣仁汤通过脑-肠轴发挥抗抑郁作用提供了线索和基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bromet E, Andrade L H, Hwang I, *et al.* Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode [J]. *BMC Med*, 2011, 9: 90.
- [2] 中国科学报. 2022 版心理健康蓝皮书《中国国民心理健康发展报告 (2021—2022)》 [EB/OL]. (2022-06-29) [2023-02-27] https://www.cas.cn/cm/202302/t20230227_4875996.shtml
- [3] Herrman H, Kieling C, McGorry P, *et al.* Reducing the global burden of depression: A lancet-world psychiatric association commission [J]. *Lancet*, 2019, 393(10189): e42-e43.
- [4] 朱晶萍. 酸枣仁汤加减治疗产后抑郁症疗效观察 [J]. *新中医*, 2014, 46(7): 105-106.
- [5] 王芳, 张君奇. 酸枣仁汤联合文拉法辛治疗抑郁伴失眠临床观察 [J]. *实用中医药杂志*, 2023, 39(10): 2019-2021.
- [6] 张宇. 归脾汤合酸枣仁汤治疗抑郁症疗效观察 [J]. *光明中医*, 2017, 32(4): 512-514.
- [7] 罗焕彬, 庞伟, 张长春, 等. 甘麦大枣汤合酸枣仁汤加减治疗肝郁脾虚型抑郁症的临床研究 [J]. *哈尔滨医药*, 2022, 42(2): 121-123.
- [8] 田旭升, 张策, 龚永涛, 等. 酸枣仁汤对抑郁模型大鼠海马 CaMK II 基因表达影响的实验研究 [J]. *中医药信息*, 2019, 36(6): 12-17.
- [9] Du Y Y, He B S, Wu B, *et al.* Suanzaoren decoction improves depressive-like behaviors by regulating the microbiota-gut-brain axis *via* inhibiting TLR4/NFκB/NLRP3 inflammation signal pathway [J]. *J Chem Neuroanat*, 2023, 134: 102349.
- [10] 夏寒星. 酸枣仁汤抗抑郁实验研究 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2010, 34(1): 52-53.
- [11] 吴江, 韩瑞, 赵妮, 等. 基于液质联用代谢组学技术的酸枣仁汤抗抑郁作用机制研究 [J]. *药学报*, 2023, 58(7): 1952-1962.
- [12] Yan Y, Li J H, Zhang Y J, *et al.* Screening the effective components of Suanzaoren decoction on the treatment of chronic restraint stress induced anxiety-like mice by integrated chinmedomics and network pharmacology [J]. *Phytomedicine*, 2023, 115: 154853.
- [13] Liu W, Ge T T, Leng Y S, *et al.* The role of neural plasticity in depression: From hippocampus to prefrontal cortex [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 6871089.
- [14] Nikolova V L, Smith M R B, Hall L J, *et al.* Perturbations in gut microbiota composition in psychiatric disorders: A review and meta-analysis [J]. *JAMA Psychiatry*, 2021, 78(12): 1343-1354.
- [15] 徐建奎. 方剂学. [M]. 上海科技出版社, 1983: 219.
- [16] Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation [J]. *Psychopharmacology*, 1997, 134(4): 319-329.
- [17] 付鑫焱, 卢蕴容, 吴娟利, 等. 重症抑郁障碍患者血浆天冬氨酸和甘氨酸及天冬酰胺水平的变化 [J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2012, 41(2): 132-138.
- [18] Tian J S, Peng G J, Gao X X, *et al.* Dynamic analysis of the endogenous metabolites in depressed patients treated with TCM formula Xiaoyaosan using urinary ¹H NMR-based metabolomics [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 158 Pt A: 1-10.
- [19] Pan J X, Xia J J, Deng F L, *et al.* Diagnosis of major depressive disorder based on changes in multiple plasma neurotransmitters: A targeted metabolomics study [J]. *Transl Psychiatry*, 2018, 8(1): 130.
- [20] Chen Y P, Wang C, Xu J P. Chronic unpredictable mild stress induced depression-like behaviours and glutamate-glutamine cycling dysfunctions in both blood and brain of mice [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 280-286.
- [21] Li Z Y, Zheng X Y, Gao X X, *et al.* Study of plasma metabolic profiling and biomarkers of chronic unpredictable mild stress rats based on gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(24): 3539-3546.
- [22] Wang Y B, Cai X Y, Ma Y C, *et al.* Metabolomics on depression: A comparison of clinical and animal research [J]. *J Affect Disord*, 2024, 349: 559-568.
- [23] Zheng P, Fang Z, Xu X J, *et al.* Metabolite signature for diagnosing major depressive disorder in peripheral blood mononuclear cells [J]. *J Affect Disord*, 2016, 195: 75-81.
- [24] Liu X J, Lv M, Wang Y Z, *et al.* Anti-depressive effects of Xiaoyaosan, Shugan and Jianpi herbal treatments: Role on the gut microbiome of CUMS rats [J]. *Phytomedicine*, 2021, 87: 153581.
- [25] Slykerman R F, Hood F, Wickens K, *et al.* Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in pregnancy on postpartum symptoms of depression and anxiety: A randomised double-blind placebo-controlled trial [J]. *EBioMedicine*, 2017, 24: 159-165.
- [26] 王祯, 高娟娟, 谢艾迪, 等. 雪菊提取物体外抑菌及其对 CUMS 抑郁小鼠 4 种肠道菌的影响 [J]. *中国食品添加剂*, 2025, 36(1): 50-58..
- [27] Zhao Y, Qin S, Yang Z, *et al.* Gastrodin ameliorates

- depressive-like behaviors via modulating gut microbiota in CUMS-induced mice [J]. *Behav Brain Res.* 2024, 465:114968.
- [28] Liu P H, Liu Z F, Wang J Z, *et al.* Immunoregulatory role of the gut microbiota in inflammatory depression [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3003.
- [29] 许慧, 李恋秋, 康贞, 等. 电针“四关”穴对卒中后抑郁大鼠结肠 5-羟色胺、粪便短链脂肪酸的影响 [J]. *中国针灸*, 2023, 43(5): 545-551.
- [30] Cheng L S, Wu H Q, Cai X Y, *et al.* A Gpr35-tuned gut microbe-brain metabolic axis regulates depressive-like behavior [J]. *Cell Host Microbe*, 2024, 32(2): 227-243.e6.
- [31] Hornby P J. Receptors and transmission in the brain-gut axis. II. Excitatory amino acid receptors in the brain-gut axis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280(6): G1055-G1060.
- [32] Xu S H, Liu Y Y, Pu J C, *et al.* Chronic stress in a rat model of depression disturbs the glutamine-glutamate-GABA cycle in the striatum, hippocampus, and cerebellum [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16: 557-570.
- [33] Orzylowski M, Fujiwara E, Mousseau D D, *et al.* An overview of the involvement of D-serine in cognitive impairment in normal aging and dementia [J]. *Front Psychiatry*, 2021, 12: 754032.

[责任编辑 罗 曦]