

逍遥散通过减轻海马神经炎症缓解乳腺癌性抑郁

吴迎朝^{1,2,3,4,5}, 朱仕奇^{1,2,3}, 梁嘉谊², 梁裕琪^{1,3,4,5}, 陈柳汕^{1,3,5}, 陈洁婷^{3,5}, 左 谦^{1,3,4,5*}, 陈前军^{1,2,3,4,5*}

1. 中医药广东省实验室, 广东 横琴 519031

2. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510405

3. 广州中医药大学第二附属医院 中医证候全国重点实验室, 广东 广州 510120

4. 广东省中医院 乳腺科, 广东 广州 510120

5. 广东省中医药科学院, 广东 广州 510120

摘要: **目的** 探究逍遥散防治乳腺癌性抑郁的作用机制。**方法** C57BL/6 小鼠通过原位注射 E0771 乳腺癌细胞建立荷瘤小鼠模型, 给予逍遥散干预 28 d, 通过行为学实验检测小鼠的抑郁程度, 运用蛋白组学寻找潜在的病理机制, 通过病理学分析和炎症因子检测明确乳腺癌性抑郁产生的病因以及逍遥散防治乳腺癌性抑郁的作用机制。使用脂多糖处理 BV2 小胶质细胞构建体外模型, 并使用逍遥散含药血清进行干预, 验证动物实验结果。**结果** 与模型组比较, 逍遥散显著改善乳腺癌小鼠旷场实验和高架十字迷宫实验的抑郁样行为 ($P < 0.01$ 、 0.001); 蛋白组学结果显示, 逍遥散缓解乳腺癌性抑郁与改善神经突触功能和炎症浸润等过程有关; 炎症因子检测和病理学分析结果表明, 逍遥散能减轻乳腺癌所致海马组织炎症因子浸润 ($P < 0.01$ 、 0.001), 抑制 iNOS 的表达并促进 CD206 表达, 改善神经损伤。体外实验结果显示, 逍遥散含药血清能抑制脂多糖诱导的 BV2 细胞炎症因子分泌 ($P < 0.01$ 、 0.001)。**结论** 逍遥散通过促进 M2 型胶质细胞极化, 减轻海马神经元炎症浸润性损伤, 缓解乳腺癌性抑郁症状。

关键词: 逍遥散; 乳腺癌; 抑郁; 小胶质细胞; 炎症浸润

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)11-3910-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.11.012

Xiaoyao San alleviates breast cancer depression by reducing hippocampal neuroinflammation

WU Yingchao^{1,2,3,4,5}, ZHU Shiqi^{1,2,3}, LIANG Jiayi², LIANG Yuqi^{1,3,4,5}, CHEN Liushan^{1,3,5}, CHEN Jieting^{3,5}, ZUO Qian^{1,3,4,5}, CHEN Qianjun^{1,2,3,4,5}

1. Guangdong Provincial Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Hengqin 519031, China

2. The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

3. State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

4. Department of Breast, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

5. Guangdong Academy of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Xiaoyao San (逍遥散) in preventing and treating depression caused by breast cancer. **Methods** C57BL/6 mice were injected with E0771 breast cancer cells *in situ* to establish a tumor bearing mouse model. Xiaoyao San was given to intervene for 28 d, the degree of depression in mice was detected through behavioral experiments, and the potential pathological mechanism was found through proteomics. The etiology of depression caused by breast cancer and the mechanism of Xiaoyao San in preventing and treating depression caused by breast cancer were identified through pathological analysis

收稿日期: 2025-03-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274513); 国家自然科学基金资助项目 (82305234); 国家自然科学基金资助项目 (82474504); 广东省自然科学基金资助项目 (2023A1515011115); 中医药广东省实验室 (横琴实验室) 科技研发培植项目 (HQL2024PZ023); 广州市科技计划项目 (SL2023A03J01120, SL2023A04J00228); 广东省中医院中医药科技专项科研项目 (YN2022QN32); 广东省中医证候临床研究重点实验室项目 (YN2023ZH10); 中医湿证国家重点实验室自主项目 (QZ2023ZZ13)

作者简介: 吴迎朝 (1996—), 男, 博士研究生, 住院医师, 研究方向为中医药治疗乳腺疾病。Tel: 13169999728 E-mail: yc1996@stu2020.jnu.edu.cn

***通信作者:** 左 谦 (1989—), 女, 博士 (后), 主治医师, 研究方向为中医药治疗乳腺疾病。Tel: 13580536209 E-mail: 827649822@qq.com
陈前军 (1972—), 男, 博士, 主任中医师, 博士生导师, 研究方向为中医药治疗乳腺疾病。Tel: 18688883505 E-mail: cqj55@163.com

and inflammatory factor detection. An *in vitro* model of BV2 microglia cells treated with lipopolysaccharide was constructed, and intervened with Xiaoyao San drug containing serum to verify the results of animal experiments. **Results** Compared with model group, Xiaoyao San significantly improved the depressive behavior of breast cancer mice in open field test and elevated cross maze test ($P < 0.01, 0.001$); The proteomic results showed that the relief of breast cancer-related depression by Xiaoyao San was related to the improvement of synaptic function and inflammatory infiltration; The results of inflammatory factor detection and pathological analysis showed that Xiaoyao San could reduce the inflammatory factor infiltration in hippocampus caused by breast cancer ($P < 0.01, 0.001$), inhibit the expression of iNOS and promote the expression of CD206, and improve nerve injury. The *in vitro* experimental results showed that the serum containing Xiaoyao San could inhibit the secretion of inflammatory factors in BV2 cells induced by lipopolysaccharide ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** Xiaoyao San could promote the polarization of M2 type glial cells, alleviate the inflammatory and invasive damage of hippocampal neurons, and alleviate the depressive symptoms caused by breast cancer.

Key words: Xiaoyao San; breast cancer; depression; microglia; inflammatory infiltration

尽管乳腺癌的现代医学防治策略日新月异,但 2024 年美国癌症协会公布的 2022 年癌症统计数据显示,乳腺癌位居所有新诊断癌症病例的首位^[1];此外,中国疾病预防控制中心日前发布的数据显示,我国女性乳腺癌发病率位居所有癌症的第 2 位^[2]。临床研究显示,乳腺癌患者往往伴随着不同程度的情绪和精神障碍^[3]。有研究指出,乳腺患者发生抑郁比例高于其他癌种的患者^[4]。然而以往针对乳腺癌患者的治疗主要聚焦于肿瘤的本身,对患者的情绪状态缺乏关注,导致癌因性抑郁这一重要领域缺乏研究。目前针对伴随抑郁症状的乳腺癌患者,并没有公认的、有效的临床治疗方案,发病机制不清是其主要原因之一。因此,深入开展乳腺癌性抑郁的研究,并寻找有效的治疗方法具有非常重要的临床意义。

中医学认为,“郁”伴随着乳腺癌发生发展及治疗的全过程^[5],不仅如此,抑郁还会增加乳腺癌患者的复发风险,一项对 282 203 例乳腺癌患者抑郁与生存预后的荟萃分析显示抑郁是影响乳腺癌预后的独立危险因素^[6],这提示了抑郁和乳腺癌两者互为因果,相互促进,因而阻断其中的一个环节就能够对乳腺癌的防治起到重要作用。鉴于目前乳腺癌发病率居高不下的现象,提示现代医学理论与方法主导下的乳腺癌防治策略仍存在其局限性。因此,在中医理论的指导下,研究乳腺癌治疗过程中不良反应防治的新理论、新机制、新方法对乳腺癌的防治具有全球性的战略意义。

逍遥散是传统中医名方,出自《太平惠民和剂局方》,具有疏肝解郁、养血健脾之功效,主治肝郁血虚脾弱证。临床观察显示,逍遥散对改善乳腺癌患者抑郁等不良情绪有较好的临床效果^[7],但相关作用机制的研究未见报道。此外,课题组前期研究

已证实逍遥散可以改善乳腺癌荷瘤小鼠的抑郁样行为^[8],但其确切的生物学机制尚未被充分研究。因此有必要深入探讨逍遥散防治乳腺癌性抑郁的作用机制,为进一步应用中医药手段防治肿瘤相关的不良反应提供理论依据。

1 材料

1.1 动物与细胞株

SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 30 只,6 周龄,体重(18±1)g,购自广东维通利华实验动物技术有限公司(质量合格证号 NO.44829700003357)。小鼠饲养于广东省中医院实验动物管理中心,每笼 5 只,自由进食饮水,12 h 光照/12 h 黑暗。动物实验经广东省中医院实验动物伦理委员会审核通过,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定,实验动物伦理批准编号为 2023079。

小鼠 E0771 乳腺癌细胞株和小鼠 BV2 小胶质细胞株由广东省中医院陈前军教授课题组提供,所有细胞株均经短串联重复序列鉴定。

1.2 药品与试剂

胎牛血清(批号 10270106)、青链霉素混合液(批号 10378016)、DMEM 培养基(批号 11965092)购自美国 Gibco 公司;逍遥散(国药准字 Z20023353,批号 221101)购自北京勃然制药有限公司;小鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒(批号 EK201B-48)、IL-6 ELISA 试剂盒(批号 EKEK206/3-48)均购自联科生物;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 批号 11056)购自美国 MedChemExpress 公司;诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体(批号 13120T)、甘露糖受体(mannose receptor, MR/CD206)抗体(批号 24595T)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(批号

3670T)、离子钙结合蛋白 1 (ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba1) 抗体 (批号 17198T) 均购自美国 CST 公司。

1.3 仪器

三气培养箱、Cellometer mini 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); EthoVision XT 14 行为学分析平台 [诺达思 (北京) 信息技术有限责任公司]; IX71 型显微镜 (日本 Olympus 公司); HT7800/HT7700 型透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM, 日本 Hitachi 公司); JY92-IIN 型超声破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 5702R 型低速离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

E0771 细胞和 BV2 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基, 置于含 5% CO₂、37 °C 恒温的三气培养箱中培养。每 4 小时更换 1 次培养基, 待细胞生长密度达到 90% 时进行常规传代培养, 采用对数生长期的细胞进行后续实验。

2.2 乳腺癌小鼠模型构建及干预

参照课题组前期研究^[9]构建荷瘤动物模型, C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周后, 随机将 10 只小鼠纳入对照组, 其余小鼠在右侧第 4 乳腺脂肪垫处注射共计 2×10^5 个 E0771 细胞, 建立荷瘤乳腺癌模型。注射乳腺癌细胞 7 d 后, 将 20 只荷瘤小鼠随机分为模型组和逍遥散 (6.3 g/kg, 相当于临床等效剂量) 组, ig 给予药物干预, 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续 28 d。在给药结束后第 2 天进行行为学检测并取材。

2.3 行为学检测

2.3.1 旷场实验 参照课题组前期研究^[10], 将小鼠放入旷场实验箱中 (40 cm $\times$ 40 cm $\times$ 30 cm), 使用摄像机记录其自发运动情况, 实验在昏暗的光线下进行, 记录时长为 5 min。采用 EthoVision XT 14 软件分析运动轨迹, 记录总运动路程和中央区 (13.3 cm $\times$ 13.3 cm) 停留时间。

2.3.2 高架十字迷宫实验 参照课题组前期研究^[11], 将小鼠放入中央平台 (5 cm $\times$ 5 cm), 使用摄像机记录其 5 min 内自由探索测试场地的情况, 场地包含 2 条开臂 (30 cm $\times$ 5 cm $\times$ 0.5 cm) 和 2 条闭臂 (30 cm $\times$ 15 cm $\times$ 5 cm)。采用 EthoVision XT 14 软件分析运动轨迹, 记录总运动路程和头部进入开臂区的

次数。

2.4 取材

在行为学检测完成后, 小鼠 ip 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 眼眶后静脉丛采血, 分离血清, 置于 56 °C 水浴中灭活, 于 -20 °C 保存备用。采血后立即切除全脑组织, 于 -70 °C 保存备用。

2.5 蛋白组学分析

在获取脑组织新鲜样本并进行蛋白提取、蛋白质控和蛋白酶解后, 将样本混合并进行肽段分离, 然后进行质谱数据依赖采集 (data dependent acquisition, DDA), 然后使用 MaxQuant 软件完成搜库鉴定, 获取所有可检测的非冗余的高质量 MS/MS 图谱信息, 作为后续数据独立采集 (data independent acquisition, DIA) 定量的谱图库。采用 MSstats 软件包, 对各样品完成系统内误差校正, 归一化等步骤, 根据设定的比较组及线性混合效应模型来评估不同蛋白的差异是否显著, 以 $P < 0.05$ 作为显著性差异蛋白的筛选标准。蛋白组学数据使用 OmicShare 平台进行差异分析和富集分析^[12]; 使用仙桃学术平台 (<https://www.xiantaozi.com/>) 进行免疫浸润分析。

2.6 组织病理学分析

2.6.1 免疫荧光染色 参照课题组前期研究^[13-14], 各组小鼠新鲜脑组织用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 修块、脱水、石蜡包埋、连续切片机切片 (4 μ m 厚度), 选取海马区制作石蜡切片。抗原修复后, 滴加内源性过氧化物酶阻断剂, 室温孵育 20 min; 滴加 10% 山羊血清室温封闭 20 min, 再分别加入 iNOS、CD206、GFAP 和 Iba1 抗体, 37 °C 孵育过夜, 次日加入荧光标记的二抗, 室温避光孵育 2 h, 滴加荧光封片剂 (含 DAPI) 后封片, 荧光显微镜下选取同一层级组织观察并拍照。

2.6.2 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色 取各组小鼠脑组织石蜡切片, 二甲苯、梯度乙醇脱蜡, 苏木素染色 5 s, 1% 盐酸-乙醇分色 25 s, 伊红染色 5 s, 梯度乙醇、二甲苯脱水, 中性树胶封片静置风干, 显微镜下选取同一层级组织观察并拍照。

2.6.3 LFB 染色 取各组小鼠脑组织石蜡切片, 60 °C 固蓝染液染色 3 h, 冷却至室温后流水冲洗 1 min, 70% 乙醇浸泡 5 s 后流水冲洗 1 min, 碳酸锂分化液浸泡 5 s 后流水冲洗 5 min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下选取同一层级组织观察并拍照。

2.6.4 Nissl 染色 取各组小鼠脑组织石蜡切片,

Nissl 染液染色 15 min, 95%乙醇分色, 再次经梯度乙醇脱水 and 二甲苯透明后, 进行中性树胶封片, 显微镜下选取同一层级组织观察并拍照。

2.6.5 FJB 染色 取各组小鼠脑组织石蜡切片, 1% NaOH-80%乙醇混合液中浸泡 5 min, 后转入 70%乙醇中浸泡 2 min, 最后转入蒸馏水中浸泡 2 min, 然后将切片浸入 0.06% KMnO₄ 溶液中, 置摇床上室温孵育 20 min, 蒸馏水漂洗 3 次, 每次 10 min, 滴加 0.004% FJB 染液室温下避光孵育 30 min, 蒸馏水漂洗 3 次, 每次 1 min, 室温晾干, 无水乙醇脱水 2 min, 二甲苯透明 7 min, 滴加荧光封片剂 (含 DAPI) 后封片, 荧光显微镜下选取同一层级组织观察并拍照。

2.6.6 TEM 观察 参照课题组前期研究^[15], 各组小鼠新鲜脑组织用 2.5%戊二醛浸泡固定 4 h, 用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次, 每次 15 min, 1%锇酸浸泡固定 2 h, 0.01 mol/L PBS 漂洗干净, 再经进行丙酮梯度脱水, Epon812 浸脂, 树脂包埋, 按 37 °C (6 h)、45 °C (12 h) 和 63 °C (24 h) 的顺序进行聚合, 制成电子显微镜标本。70 nm 超薄切片, 常规醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色, TEM 观察各组小鼠海马的超微结构。

2.7 细胞模型的建立及干预

取对数生长期的 BV2 细胞, 设置对照组、模型组和逍遥散组, 使用“2.4”项下制备的各组小鼠血清代替胎牛血清培养细胞。对照组加入含对照组小鼠血清的培养基, 模型组加入含 100 ng/mL LPS 的模型组小鼠血清的培养基, 逍遥散组加入含 100 ng/mL LPS 的逍遥散组小鼠血清培养基, 处理 48 h, 收集细胞上清液。

2.8 ELISA 检测乳腺癌小鼠模型海马组织和体外模型炎症因子的水平

按照 ELISA 试剂盒说明书分别检测“2.4”项下各组小鼠海马组织和“2.7”项下各组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 水平。

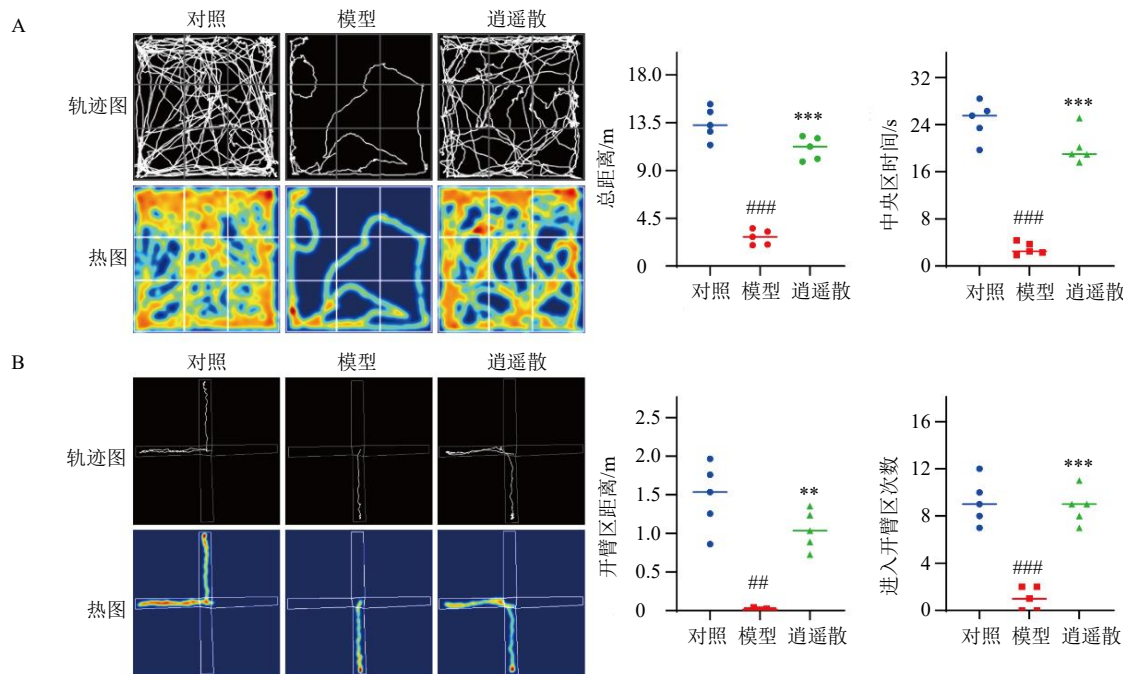
2.9 统计学分析

实验数据采用单因素方差分析进行统计学分析, 利用 SPSS 13.0 版本软件进行数据分析, 利用 GraphPad Prism 9 软件对数据进行图像可视化。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 逍遥散缓解乳腺癌引起的抑郁样行为

旷场实验 (图 1-A) 结果显示, 乳腺癌荷瘤小



A-旷场实验; B-高架十字迷宫实验; 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-open field test; B-elevated plus-maze test; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 逍遥散对乳腺癌小鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

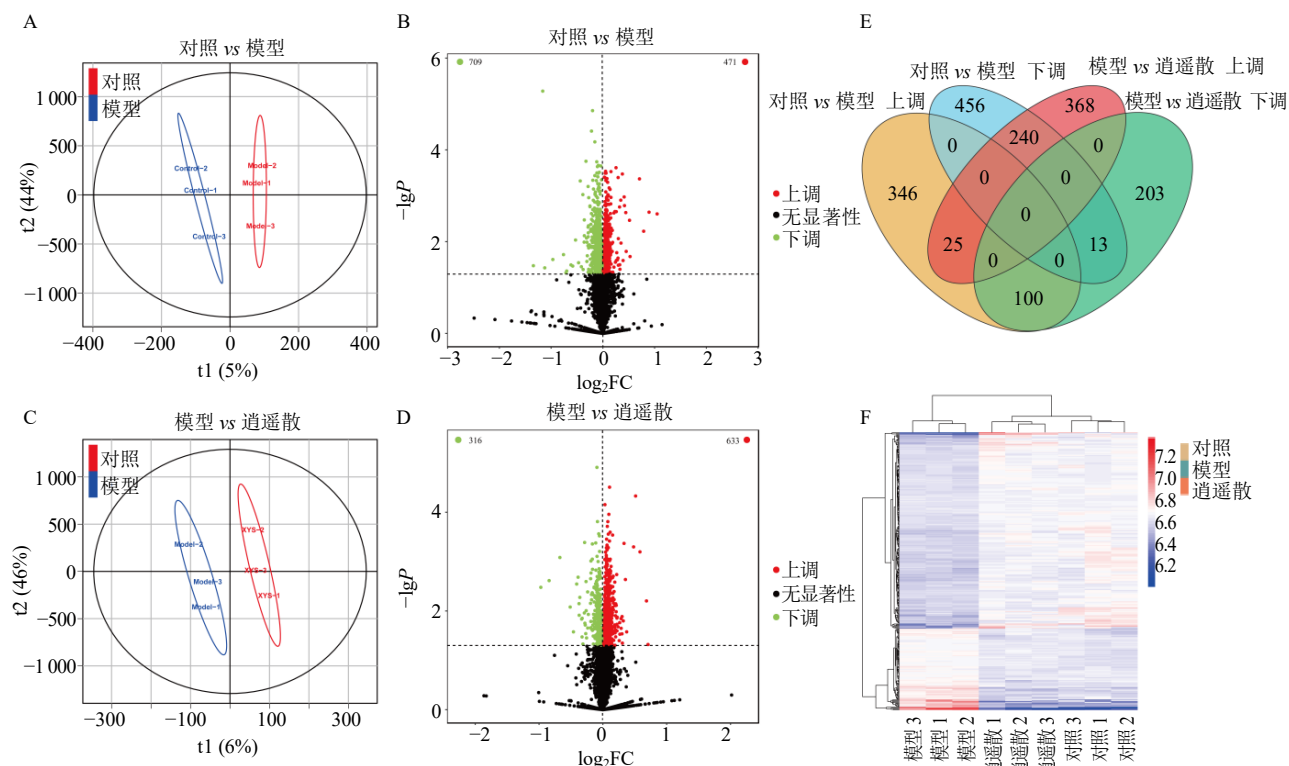
Fig. 1 Effect of Xiaoyao San on behavior of mice with breast cancer ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

鼠总运动距离和中央区停留时间较对照组显著减少 ($P < 0.001$)；高架十字迷宫实验 (图 1-B) 结果显示, 荷瘤小鼠总运动距离和进入开臂区的次数较对照组显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001)。给予逍遥散干预后, 乳腺癌荷瘤小鼠上述抑郁样行为均得到显著改善 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.2 蛋白组学分析脑组织差异表达蛋白

小鼠脑海马组织蛋白组学结果显示, 对照组与模型组、模型组与逍遥散组的样本分布表现出组内同

质、组间异质的特征 (图 2-A、C), 说明模型具有稳定性且逍遥散的干预作用显著。模型组与对照组比较, 表达上调的蛋白有 471 种, 表达下调的蛋白有 709 种 (图 2-B); 逍遥散组与模型组比较, 表达上调的蛋白有 633 种, 表达下调的蛋白有 316 种 (图 2-D)。逍遥散逆转了其中 340 种由乳腺癌模型所致的差异表达蛋白 (图 2-E), 这 340 种差异表达蛋白表达量双向聚类热图见图 2-F, 对照组和逍遥散组蛋白表达趋势较为统一, 而模型组蛋白表达趋势则与之相反。



A-对照组与模型组蛋白表达 PLS-DA 图; B-对照组与模型组蛋白表达火山图; C-模型组与逍遥散组蛋白表达 PLS-DA 图; D-模型组与逍遥散组蛋白表达火山图; E-差异表达蛋白 Venn 图; F-共同差异表达蛋白热图。

A-PLS-DA diagram of protein expression in control group and model group; B-volcano plot of protein expression in control group and model group; C-PLS-DA diagram of protein expression in model group and Xiaoyao San group; D-volcano plot of protein expression in model group and Xiaoyao San group; E-Venn diagram of differentially expressed proteins; F-heatmap of common differentially expressed proteins.

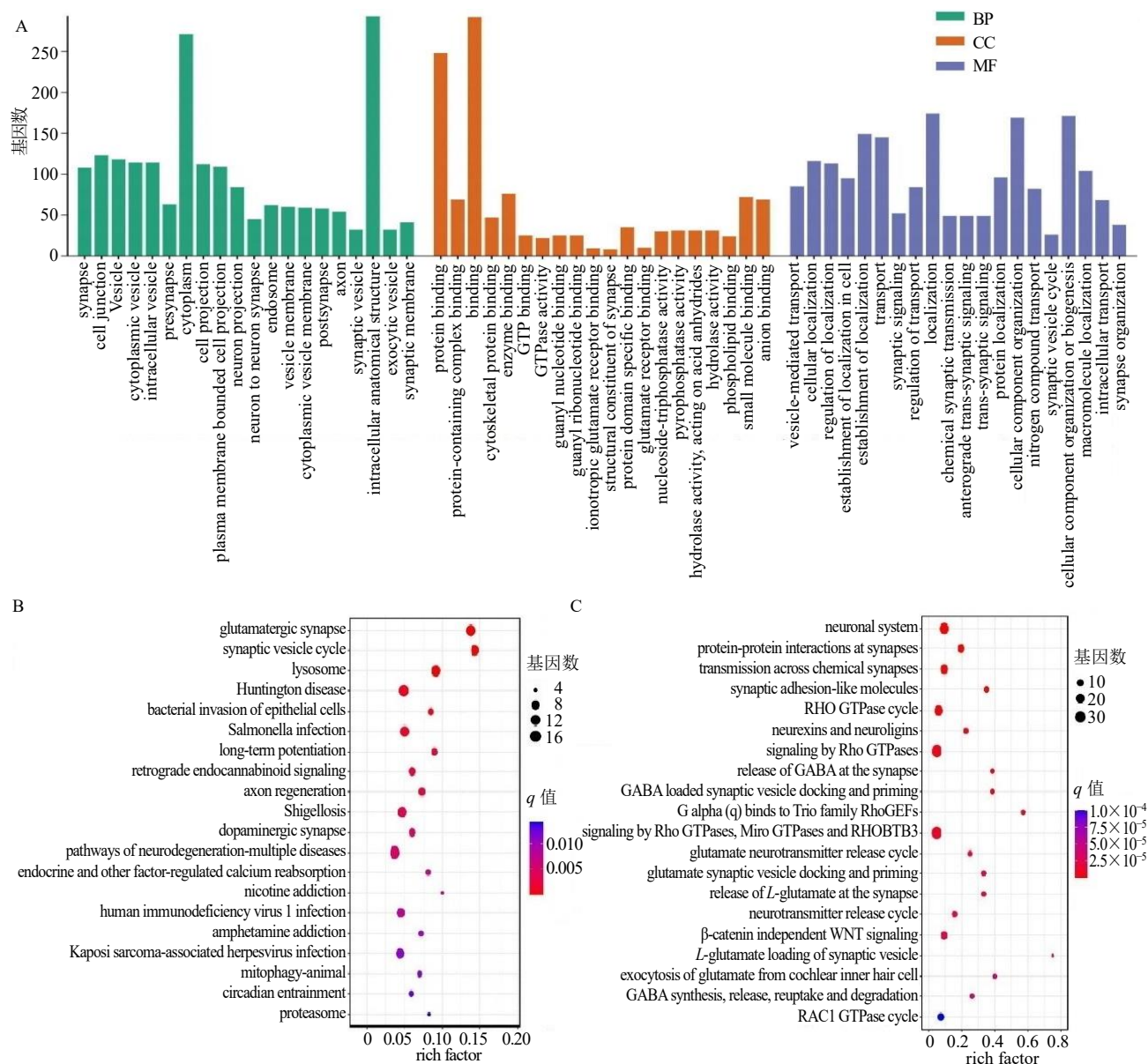
图 2 逍遥散对乳腺癌小鼠脑组织蛋白表达的影响 ($n = 3$)

Fig. 2 Effect of Xiaoyao San on protein expressions in brain tissue of breast cancer mice ($n = 3$)

3.3 富集分析提示逍遥散影响突触功能

对上述 340 种差异表达蛋白进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析, 结果显示这些蛋白在突触、神经元投射、神经元之间的突触、离子型谷氨酸受体结合、突触的结构成分、谷氨酸受体结合、突触信号、顺行突触传递信号和突触的组织等突触功能相关的细胞组成、分子功能和生物过程中被富集 (图 3-A)。京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富

集分析结果显示, 这些蛋白在谷氨酸能突触、突触囊泡循环、长时程增强、多巴胺能神经突触、神经退行性病变的途径、线粒体自噬等神经传导和神经损伤信号通路中被富集; 此外, 除信号转导和神经系统相关信号通路外, 免疫系统相关信号通路也被显著富集 (图 3-B)。Reactome 通路富集分析结果显示, 这些蛋白在神经元系统、突触中的蛋白质-蛋白质相互作用、化学突触间的传输、神经递质释放周期等神经突触相关的通路中被富集 (图 3-C)。



A-GO function enrichment analysis; B-KEGG pathway enrichment analysis; C-Reactome pathway enrichment analysis.

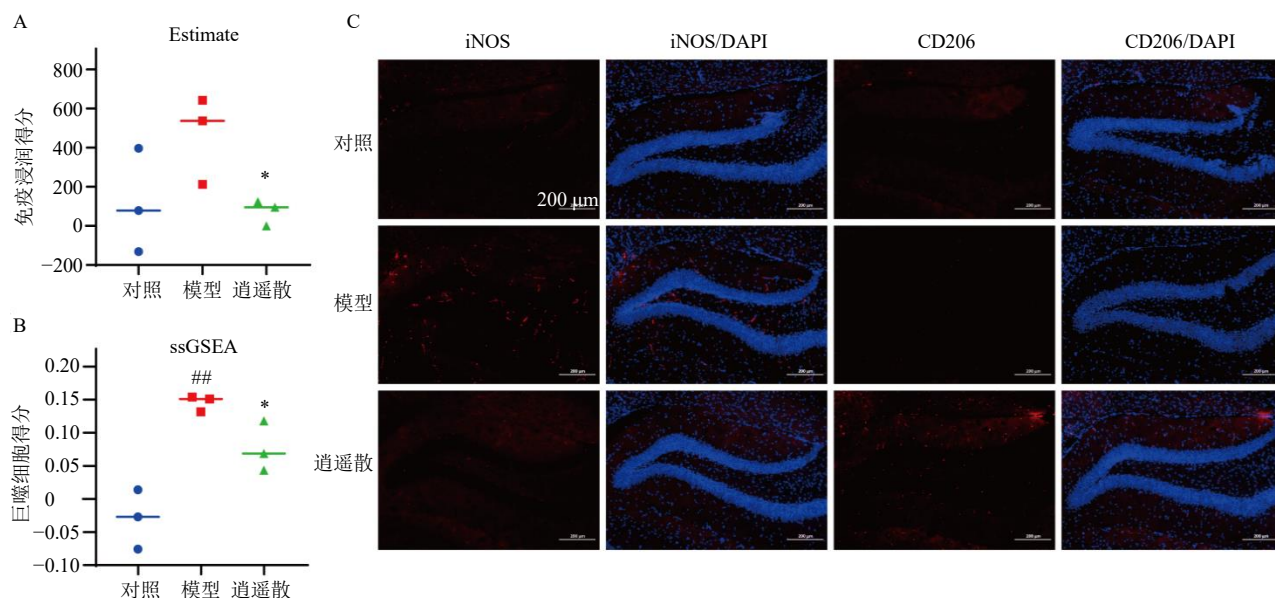
图 3 脑组织差异表达蛋白富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of differentially expressed proteins in brain tissue

3.4 逍遥散促进海马区小胶质细胞 M2 型极化

鉴于富集分析结果显示免疫系统相关信号通路被显著富集，因此对蛋白组学数据进行免疫浸润分析。Estimate 算法显示，模型组免疫浸润得分升高（图 4-A）；进一步使用单样本基因集富集分析（single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA）算法分析微环境中各类免疫细胞的富集得分，结果显示模型组巨噬细胞得分显著升高（ $P < 0.01$ ，图 4-B）；给予逍遥散干预后，免疫浸润得分和巨噬细胞得分显著降低（ $P < 0.05$ ）。由于脑组织中通常不存

在巨噬细胞，但小胶质细胞是中枢神经系统内的主要免疫细胞，具有与巨噬细胞相似的功能，因此通过免疫荧光分析与抑郁发生密切相关海马区促炎型（M1 型）小胶质细胞和抗炎型（M2 型）小胶质细胞的浸润情况。免疫荧光结果显示，对照组小鼠海马组织 M1 型和 M2 型小胶质细胞均没有出现显著浸润，模型组出现 M1 型小胶质细胞浸润；相较于模型组，逍遥散组 M1 型小胶质细胞浸润程度显著降低，而 M2 型小胶质细胞浸润程度则显著增加（图 4-C）。



A-免疫浸润分析-estimate 算法; B-免疫浸润分析-ssGSEA 算法; C-免疫荧光分析海马组织 M1 型和 M2 型小胶质细胞的浸润情况 ($\times 200$)。

A-immune infiltration analysis-estimate algorithm; B-immune infiltration analysis-ssGSEA algorithm; C-infiltration of M1 and M2 microglia in hippocampal tissue analyzed by immunofluorescence ($\times 200$).

图 4 逍遥散对海马区胶质细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Xiaoyao San on glial cells in hippocampus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 逍遥散改善乳腺癌引起的炎症性神经损伤

进一步分析海马组织的炎症因子水平, 结果显示与对照组比较, 模型组海马组织中促炎因子水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001 , 图 5-A); 而逍遥散干预后, 促炎因子水平明显降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。此外, 还观察到模型组海马组织 Iba1 和 GFAP 荧光强度增加, 提示模型组海马中的小胶质细胞和星形胶质细胞炎症反应升高; 而逍遥散干预明显降低了这 2 种胶质细胞的炎症反应 (图 5-B)。HE 染色结果显示, 模型组海马神经元表现出细胞核深染; LFB 染色结果显示, 模型组海马神经元表现出髓鞘减少; Nissl 染色结果显示, 模型组海马神经元表现出细胞质染色浓缩; FJB 染色结果显示, 模型组海马神经元出现损伤; TEM 结果显示, 模型组海马神经元中线粒体数量减少、结构紊乱, 并出现线粒体自噬小体 (图 5-C)。上述病理特征提示肿瘤负荷诱导了小鼠的海马组织炎症性神经元损伤, 给予逍遥散干预后, 肿瘤负荷导致的组织损伤得到明显改善。

3.6 逍遥散逆转 LPS 导致的 BV2 细胞炎症因子异常表达

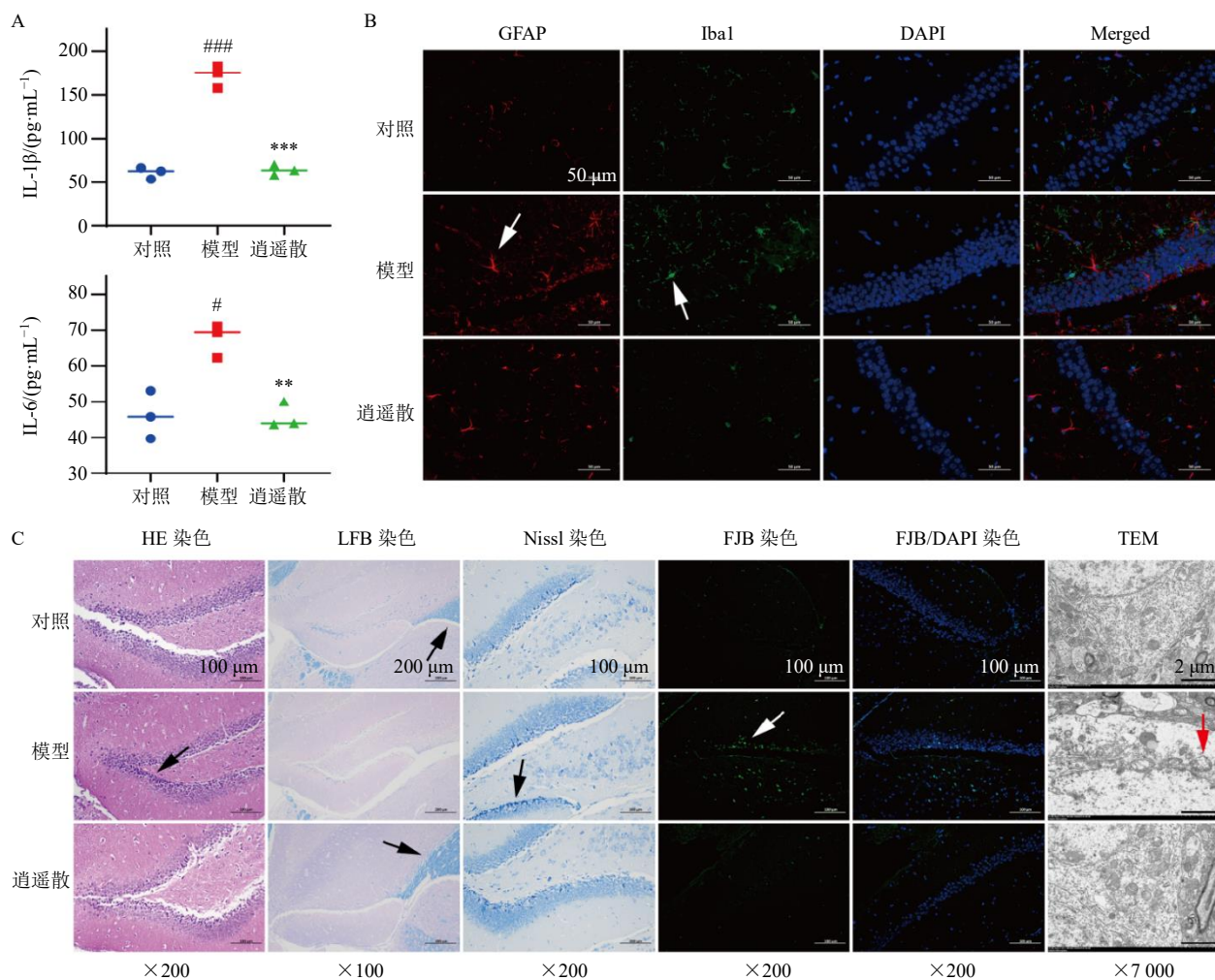
利用 BV2 细胞并使用 LPS 干预构建体外神经炎症模型。如图 6 所示, LPS 干预后, 细胞上清液中促炎因子水平显著升高 ($P < 0.01$); 给予逍遥散

含药血清干预后, 细胞上清液中促炎因子水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 进一步证实了逍遥散抑制胶质细胞活化并减轻肿瘤负荷诱导的海马神经元炎症浸润。

4 讨论

中医学将肿瘤归类于“石瘕”“癥瘕”“积聚”等范畴, 认为“痰、瘀、毒、虚”为肿瘤的主要发病机制^[16]。此外, 抑郁在中医学上称为“郁证”, 其病因病机多为痰蒙心神、心失所养, 病位在脑^[11]。癌病日久, 易痰瘀互结, 导致肝气郁滞, 肝气是机体生理功能得以正常发挥的基础动力, 以畅达为顺, 以郁滞为逆, “痰”与“气”同病则生“郁证”; 因此, 肿瘤的发展过程与抑郁的产生在病因病机上关系密切。逍遥散全方由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、生姜、薄荷、甘草 8 味中药组成, 诸药合用, 使肝郁得疏, 血虚得养, 脾弱得复, 气血兼顾, 体用并调, 肝脾同治; 有疏肝解郁、养血健脾之功用, 切合癌因性抑郁的病因病机^[17]。本研究明确了逍遥散缓解乳腺癌性抑郁的疗效, 并有力地证实了中医学疏肝健脾解郁理论指导下治疗该类治病的有效性。

现代医学研究表明, 抑郁的产生, 其重要的病理生理学机制之一是中枢神经系统炎症水平升高^[18]。



A-海马组织炎症因子水平; B-免疫荧光检测海马组织 Iba1 和 GFAP 表达 ($\times 400$, 箭头表示活化的星形胶质细胞和小胶质细胞); C-组织病理学分析 (HE 染色中箭头表示深染的细胞核, LFB 染色中箭头表示髓鞘, Nissl 染色中箭头表示固缩的染色质, FJB 染色中箭头表示变性的神经元, TEM 中箭头表示结构紊乱的线粒体)。

A-levels of inflammatory factors in hippocampal tissue; B-Iba1 and GFAP expressions in hippocampal tissue detected by immunofluorescence ($\times 400$, arrows indicate activated astrocytes and microglia); C-histopathological analysis (arrows represent deeply stained nuclei in HE staining, arrows represent myelin sheaths in LFB staining, arrows represent condensed chromatin in Nissl staining, arrows represent degenerated neurons in FJB staining, and arrows represent structurally disordered mitochondria in TEM).

图 5 逍遥散对海马区炎症反应和神经元的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Xiaoyao San on hippocampal inflammatory response and neurons ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

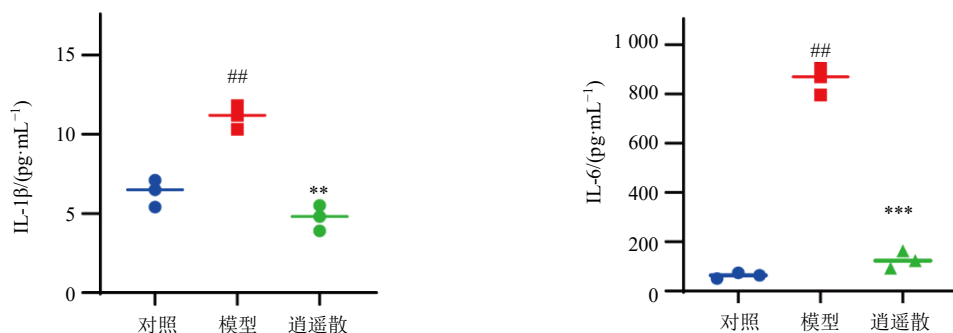


图 6 逍遥散对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of Xiaoyao San on levels of inflammatory cytokines in LPS induced BV2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

中枢神经系统的不同脑区负责不同的功能,当负责情绪调控相关的脑区出现功能异常,则可能出现抑郁症状^[19]。已有研究表明,海马的炎症浸润显著促进抑郁的产生,其机制可能与炎症导致的神经元损伤有关^[20]。在肿瘤进展过程中,会产生大量的促炎因子,这些释放到循环系统的促炎因子会在血流的作用下穿过血脑屏障,进入脑实质的促炎因子会进一步激活小胶质细胞等免疫细胞,诱发更强的中枢神经系统炎症反应,最终导致神经元发生炎症性损伤^[21]。神经元的完整性是其保持正常功能的基础,当中枢神经系统神经元出现损伤时,往往会出现认知障碍、抑郁、癫痫等精神性疾病^[22],严重者甚至威胁生命。最近有临床研究^[23]和基础研究^[24]分别指出,逍遥散能有效降低乳腺癌伴随的抑郁症状。

小鼠海马神经炎症通过 Janus 激酶 1 (Janus kinase 1, JAK1) /信号转导因子和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、核因子红细胞 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2) /血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) /核苷酸结合寡聚化结构域样受体含 pyrin 结构域蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing 3, NLRP3) 等信号通路,改变小胶质细胞 M1/M2 极化的平衡,导致神经元损伤并影响抑郁的发生^[25-27]。本研究发现,逍遥散可以显著减轻乳腺癌荷瘤小鼠的抑郁样行为,其药效机制可能是通过促进 M1 型小胶质细胞转化为 M2 型小胶质细胞,从而降低抑郁相关脑区海马的神经炎症,以保护情绪调控相关的神经元免受炎症性损害,最终挽救神经元功能。与传统的抗抑郁药物如氯胺酮^[28]、氟西汀^[29]、文拉法辛^[30]不同,逍遥散能更大程度上逆转肿瘤性炎症导致的神经元损伤,且逍遥散既往在临床上已得到广泛应用^[31],已被证实能降低乳腺癌患者的抑郁程度^[32]。氯胺酮的成瘾性是一个备受争议的问题^[33],氟西汀也被报道具有增加跌倒、骨折和晕厥的风险^[34]; Meta 分析显示逍遥散不存在严重的不良反应^[35],其安全性比传统的抗抑郁药物更优。此外,由于其与传统抗抑郁药物的作用机制不同,其未来在用于治疗乳腺癌等癌因性抑郁时与传统抗抑郁药物可能存在潜在的协同增效作用。因此,本研究初步揭示了乳腺癌性抑郁的病理学机制,并提出了一种有效、安全治疗方案,有望填补乳腺癌性抑郁研究领域的治疗空白,为乳

腺癌患者的综合治疗提供一种潜在的策略。

由于血脑屏障的存在,逍遥散中的多数成分并不能通过血脑屏障进入大脑中直接起到治疗作用,且逍遥散可能具有多成分、多靶点的多重药效机制。因而后续需要进一步运用人工神经网络、DeepSeek、Chat GPT 等前沿大数据人工智能的方法,从逍遥散中筛选出具有高药用潜力的先导化合物,为进一步的药理学验证和后续的药物开发提供全面的数据支持。

综上,逍遥散可能通过促进 M2 型小胶质细胞极化减轻肿瘤负荷引起的海马组织炎症浸润,进而缓解海马神经元的炎症性损伤,避免海马神经元情志调控相关功能的异常,最终缓解乳腺癌引起的抑郁症状。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Siegel R L, Giaquinto A N, Jemal A. Cancer statistics, 2024 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(1): 12-49.
- [2] Han B F, Zheng R S, Zeng H M, *et al*. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(1): 47-53.
- [3] Biparva A J, Raoofi S, Rafiei S, *et al*. Global depression in breast cancer patients: Systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2023, 18(7): e0287372.
- [4] Fathian M, Akbari F. Breast cancer symptom profile longitudinal changes: Data mining study [J]. *BMJ Support Palliat Care*, 2024: spcare-2023-004566.
- [5] 戴金芳, 赵益, 孙有智. 乳腺癌中医病因病机探析 [J]. *光明中医*, 2017, 32(7): 1069-1072.
- [6] Wang X, Wang N, Zhong L D, *et al*. Prognostic value of depression and anxiety on breast cancer recurrence and mortality: A systematic review and meta-analysis of 282, 203 patients [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(12): 3186-3197.
- [7] 胡正军, 任广胜, 金益峰, 等. 逍遥散加减治疗肝郁脾虚型乳腺癌患者癌症相关性疲乏疗效观察 [J]. *中医药信息*, 2024, 41(8): 52-57.
- [8] Luo T Y, Zhang Y M, Liu X Y, *et al*. The central nervous system can directly regulate breast cancer progression and blockage by quercetin [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(12): 999.
- [9] Wu Y C, Pi D J, Zhou S Y, *et al*. Ginsenoside Rh₃ induces pyroptosis and ferroptosis through the STAT3/p53/Nrf2 axis in colorectal cancer cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2023, 55(4): 587-600.
- [10] Wu Y C, Pi D J, Chen Y L, *et al*. Yifei Sanjie Pills alleviate chemotherapy-related fatigue by reducing skeletal muscle injury and inhibiting tumor growth in lung cancer mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022:

- 2357616.
- [11] 欧阳明子, 崔佳琦, 王慧, 等. 开心散通过减轻前额叶皮质铁死亡缓解小鼠的阿霉素化疗性抑郁 [J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(8): 1441-1449.
 - [12] Mu H Y, Chen J Z, Huang W J, *et al.* OmicShare tools: A zero-code interactive online platform for biological data analysis and visualization [J]. *Imeta*, 2024, 3(5): e228.
 - [13] Wu Y C, Pi D J, Chen Y L, *et al.* Ginsenoside Rh₄ inhibits colorectal cancer cell proliferation by inducing ferroptosis via autophagy activation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 6177553.
 - [14] Wu Y C, Pi D J, Zhou S Y, *et al.* Yiqi Chutan Formula reverses cisplatin-induced apoptosis and ferroptosis of skeletal muscle by alleviating oxidative stress [J]. *Integr Cancer Ther*, 2023, 22: 15347354231172117.
 - [15] Wu Y C, Zhou S Y, Pi D J, *et al.* Deciphering the molecular mechanism of Yifei-Sanjie Pill in cancer-related fatigue [J]. *J Oncol*, 2023, 2023: 5486017.
 - [16] 吴迎朝, 左谦, 罗薇, 等. 益肺散结丸缓解小鼠癌因性骨骼肌萎缩的作用 [J]. 南方医科大学学报, 2023, 43(11): 1839-1849.
 - [17] 谢志强, 胡靖文, 曾九僧, 等. 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 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2283-2291.
 - [18] Troubat R, Barone P, Leman S, *et al.* Neuroinflammation and depression: A review [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 151-171.
 - [19] 吴迎朝, 梁裕琪, 左谦, 等. 中枢神经系统环路在抑郁促进乳腺癌进程中的作用 [J]. 肿瘤防治研究, 2025, 52(1): 25-30.
 - [20] Wu Y C, Wang H, Liang Z, *et al.* Elucidating the mechanism of traditional Chinese medicine formula (Yifei-Sanjie Pill) in alleviating the chemobrain based on network pharmacology and experimental verification [J]. *J Tradit Complement Med*, 2024, doi: 10.1016/j.jtcme.2024.11.008.
 - [21] Lyu W J, Ouyang M Z, Ma X M, *et al.* Kai-Xin-San attenuates doxorubicin-induced cognitive impairment by reducing inflammation, oxidative stress, and neural degeneration in 4T1 breast cancer mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5521739.
 - [22] 冯渝梅, 李惠珍, 艾志福, 等. 柴胡防治精神神经疾病的共有物质基础及其生物学机制系统解析 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 307-319.
 - [23] Pan J H, Fu S L, Zhou Q, *et al.* Modified Xiaoyao San combined with chemotherapy for breast cancer: A systematic review and Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1050337.
 - [24] Bai Y T, Niu L J, Song L H, *et al.* Uncovering the effect and mechanism of Jiawei Xiaoyao Wan in treating breast cancer complicated with depression based on network pharmacology and experimental analysis [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155427.
 - [25] Lu R R, Zhang L, Wang H H, *et al.* Echinacoside exerts antidepressant-like effects through enhancing BDNF-CREB pathway and inhibiting neuroinflammation via regulating microglia M1/M2 polarization and JAK1/STAT3 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 13: 993483.
 - [26] Tao W W, Hu Y W, Chen Z Y, *et al.* Magnolol attenuates depressive-like behaviors by polarizing microglia towards the M2 phenotype through the regulation of Nrf2/HO-1/NLRP3 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153692.
 - [27] Liu B P, Zhang Y P, Yang Z Y, *et al.* ω -3 DPA protected neurons from neuroinflammation by balancing microglia M1/M2 polarizations through inhibiting NF- κ B/MAPK p38 signaling and activating neuron-BDNF-PI3K/AKT pathways [J]. *Mar Drugs*, 2021, 19(11): 587.
 - [28] Chen T, Cheng L, Ma J W, *et al.* Molecular mechanisms of rapid-acting antidepressants: New perspectives for developing antidepressants [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 194: 106837.
 - [29] Casarotto P C, Giry M, Fred S M, *et al.* Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors [J]. *Cell*, 2021, 184(5): 1299-1313.e19.
 - [30] Lense X M, Hiemke C, Funk C M, *et al.* Venlafaxine's therapeutic reference range in the treatment of depression revised: A systematic review and meta-analysis [J]. *Psychopharmacology*, 2024, 241(2): 275-289.
 - [31] Zhang Y Q, Han M, Liu Z J, *et al.* Chinese herbal formula Xiao Yao San for treatment of depression: A systematic review of randomized controlled trials [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 931636.
 - [32] Wang C, Yin L F. Xiaoyaosan Formula augments adjuvant therapy and enhances postoperative breast cancer care [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1388646.
 - [33] Simmler L D, Li Y, Hadjas L C, *et al.* Dual action of ketamine confines addiction liability [J]. *Nature*, 2022, 608: 368-373.
 - [34] George M M, Deamer R L, Do D. Adverse drug events associated with nortriptyline compared with paroxetine and alternative medications in an older adult population: A retrospective cohort study in Southern California [J]. *BMJ Open*, 2023, 13(12): e076028.
 - [35] Zhou X, Ma Q Y, Yan Z Q, *et al.* Efficacy and safety of Chinese patent medicine Xiao Yao San in polycystic ovary syndrome: A systematic review and Meta-analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 313: 116517.

[责任编辑 李亚楠]