

首荟通便胶囊通过调节肠道菌群、抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路及恢复神经递质平衡改善卒中后抑郁

李若秋¹, 潘成龙^{1#}, 王宇婷¹, 王融融¹, 曹庆宇³, 沈萌萌², 叶青⁴, 周继栋², 牛德军², 潘丽红², 姚景春², 曾振^{2*}, 张贵民^{1*}

1. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003
2. 鲁南制药集团有限公司 经典方与现代中药整合创新国家重点实验室, 山东 临沂 276005
3. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133002
4. 上海中医药大学附属龙华医院 神经内科, 上海 200032

摘要: 目的 采用多组学策略探讨首荟通便胶囊 (Shouhui Tongbian Capsule, SHTB) 对卒中后抑郁 (post-stroke depression, PSD) 的治疗效果及其作用机制。方法 通过光化学诱导脑卒中联合慢性不可预见性温和应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 建立 PSD 小鼠模型。通过行为学测试评价抑郁样行为, 并通过组织学分析评估神经元和髓鞘结构。综合运用肠道菌群 16S rDNA 测序、粪便和脑组织代谢组学、蛋白组学、神经递质检测及 Western blotting 等方法, 系统解析其潜在机制。此外, 通过抗生素清除肠道菌群, 以验证 SHTB 的作用是否依赖于肠道微生物。结果 SHTB 能显著改善 PSD 小鼠的抑郁样行为及神经元形态。16S rDNA 测序分析结果显示, SHTB 可恢复肠道菌群平衡, 表现为有益菌属 (如肠球菌属 *Enterococcus*) 的增加以及促炎菌属 (如颤螺菌属 *Oscillibacter*、丹毒丝菌科 *Erysipelotrichaceae*) 的减少。代谢组学结果表明, SHTB 可纠正脂肪酸代谢紊乱, 特别是亚油酸和花生四烯酸通路, 并降低神经炎症相关代谢物水平。蛋白组学和神经递质检测进一步揭示, SHTB 能够恢复 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、多巴胺 (dopamine, DA) 和去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 水平 ($P < 0.05$), 并减少谷氨酸的异常累积 ($P < 0.05$), 同时抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 炎症通路的过度激活 ($P < 0.05$)。在抗生素清除肠道菌群后, 上述效应均显著减弱, 表明 SHTB 的功效具有肠道菌群依赖性。结论 SHTB 能通过肠道菌群依赖性的方式, 重塑肠道菌群、修复肠道屏障、调控脂肪酸代谢、抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路介导的外周及中枢炎症反应、并恢复关键神经递质平衡, 多维度改善肠-脑轴功能, 从而发挥抗 PSD 及神经保护作用。

关键词: 卒中后抑郁; 首荟通便胶囊; 肠道菌群; 脂肪酸代谢; 神经炎症; 神经递质失衡; TLR4/MyD88/NF- κ B 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)07-2583-19

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.07.014

Shouhui Tongbian Capsule alleviate post-stroke depression by modulating gut microbiota, inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway and restoring neurotransmitter homeostasis

LI Ruoqiu¹, PAN Chenglong¹, WANG Yuting¹, WANG Rongrong¹, CAO Qingyu³, SHEN Mengmeng², YE Qing⁴, ZHOU Jidong², NIU Dejun², PAN Lihong², YAO Jingchun², ZENG Zhen², ZHANG Guimin¹

1. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China
2. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276005, China
3. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China
4. Department of Neurology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

收稿日期: 2025-11-18

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2022LZY021)

作者简介: 李若秋, 硕士研究生, 研究方向为药理学。E-mail: 369495752@qq.com

#共同第一作者: 潘成龙, 硕士研究生, 研究方向为药理学。E-mail: ll07140605@163.com

*通信作者: 曾振, 研究员, 从事新药药理与毒理研究。E-mail: 18560571272@163.com

张贵民, 研究员, 硕士生导师, 从事新药药理与毒理研究。E-mail: lunanzhangguimin@yeah.net

Abstract: Objective To explore the therapeutic effect and mechanism of Shouhui Tongbian Capsule (首荟通便胶囊, SHTB) on post-stroke depression (PSD) using a multi-omics strategy. **Methods** A mouse model of PSD was established by photochemical induction of stroke combined with chronic unpredictable mild stress (CUMS). Depressive-like behaviors were evaluated by behavioral tests, and neuronal and myelin sheath structures were assessed by histological analysis. A comprehensive approach integrating 16S rDNA sequencing of gut microbiota, metabolomics of feces and brain tissues, proteomics, neurotransmitter detection and Western blotting was employed to systematically elucidate the potential mechanism. Additionally, gut microbiota was depleted by antibiotics to verify whether the effect of SHTB is dependent on intestinal microbes. **Results** SHTB significantly improved depressive-like behaviors and neuronal morphology in PSD mice. 16S rDNA sequencing analysis showed that SHTB restored the balance of gut microbiota, characterized by an increase in beneficial genera (e.g., *Enterococcus*) and a decrease in pro-inflammatory genera (e.g., *Oscillibacter*, *Erysipelotrichaceae*). Metabolomic results indicated that SHTB could correct fatty acid metabolism disorders, particularly linoleic acid and arachidonic acid pathways, and reduce the levels of neuroinflammation-related metabolites. Proteomics and neurotransmitter detection further revealed that SHTB could restore the levels of serotonin (5-HT), γ -aminobutyric acid (GABA), dopamine (DA) and norepinephrine (NE) ($P < 0.05$), reduce the abnormal accumulation of glutamate ($P < 0.05$), and inhibit the excessive activation of TLR4/MyD88/NF- κ B inflammatory pathway ($P < 0.05$). After depletion of gut microbiota by antibiotics, the above effects were significantly attenuated, indicating that the efficacy of SHTB was gut microbiota-dependent. **Conclusion** SHTB could restore the gut microbiota, repair the intestinal barrier, regulate fatty acid metabolism, inhibit TLR4/MyD88/NF- κ B pathway-mediated peripheral and central inflammatory responses, and restore the balance of key neurotransmitters through a gut microbiota-dependent mechanism. This multi-dimensional improvement in the gut-brain axis function contributes to its anti-PSD and neuroprotective effects.

Key words: post-stroke depression; Shouhui Tongbian Capsule; gut microbiota; fatty acid metabolism; neuroinflammation; neurotransmitter imbalance; TLR4/MyD88/NF- κ B pathway

卒中后抑郁 (post-stroke depression, PSD) 是脑血管事件后最常见且最严重的神经精神并发症之一, 在缺血性脑卒中患者中的患病率可达 30%~50%^[1]。PSD 不仅显著降低患者康复积极性、加重认知功能障碍, 还会延缓功能恢复, 并提高卒中复发与死亡风险^[2]。目前临床常用的抗抑郁治疗药物如选择性 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 再摄取抑制剂, 在 PSD 中的疗效有限, 且伴随出血风险及药物相互作用等不良反应^[3]。因此, 临床上迫切需要开发更安全、更有效的替代干预手段。

近年来, “肠-脑轴”被认为是连接肠道与中枢神经系统的关键双向调控体系, 在抑郁、焦虑、帕金森病以及卒中相关并发症中发挥重要作用^[4-5]。肠道菌群失衡通常表现为益生菌减少及促炎菌增殖, 可通过诱发系统性炎症、破坏肠黏膜屏障、改变色氨酸代谢及神经递质 5-HT、多巴胺 (dopamine, DA)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 合成等途径, 加重抑郁样行为^[6]。此外, 肠道菌群紊乱及脂肪酸代谢异常能够激活核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路, 诱导神经炎症^[7]。当肠球菌等有益菌减少, 丹毒丝菌等促炎菌增多时, 可进一步增强肠道通透性, 促进脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 易位并激活 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4,

TLR4) /髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) /NF- κ B 级联反应, 导致促炎细胞因子如白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 升高、小胶质细胞活化和神经元损伤^[8-10], 进而破坏神经递质稳态并加剧情绪障碍^[11]。

传统中医药以整体性、系统性与多靶点调节为特征, 已广泛用于神经精神疾病的治疗^[12]。首荟通便胶囊 (Shouhui Tongbian Capsule, SHTB) 由何首乌、芦荟、决明子、枸杞子、阿胶、人参、白术及枳实 8 味药材组成, 是用于治疗功能性便秘及脾虚相关胃肠功能障碍的经典方剂^[13-14]。SHTB 的化学指纹图谱已通过 GC-MS 和 UPLC-Q-Exactive MS 得到解析, 并明确质量特征^[15]; 本研究所用 SHTB 的来源与质量标准均与相关研究一致。既往研究表明, SHTB 不仅具有通便作用, 还可通过调节肠道菌群及脂质代谢恢复肠屏障功能、缓解全身炎症, 从而改善肠道稳态与胃肠动力^[16]。此外, SHTB 能通过重塑脂肪酸代谢来改善大鼠缺血性卒中^[17]。以上发现提示, SHTB 可能通过“肠道菌群-脂质代谢-神经炎症-神经递质”轴影响中枢功能。

然而, 现有关于 SHTB 的研究仍主要集中于胃肠功能调节或缺血性卒中本身, 其在 PSD 这一典型

“肠-脑轴相关神经精神并发症”中的作用尚缺乏系统研究。尤其 SHTB 是否能够通过肠道菌群重塑介导脂肪酸代谢与神经炎症的协同调控,从而恢复中枢神经递质稳态并改善抑郁样行为,目前尚无直接实验证据。此外,既往研究多停留在相关性描述层面,其抗抑郁作用是否真正依赖于肠道菌群的存在仍不明确。本研究采用光化学诱导脑缺血并联合慢性不可预见性温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)建立 PSD 小鼠模型,以系统评估 SHTB 的治疗作用。通过整合 16S rDNA 测序、粪便/脑组织非靶向代谢组学、脑蛋白组学、神经递质检测、行为学评估及脑超微结构分析等技术,阐明 SHTB 缓解抑郁样行为的作用机制,以期为 PSD 的药物干预提供潜在靶点。

1 材料

1.1 动物

104 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠,8 周龄,体质量 25~30 g,购自常州卡文斯实验动物有限公司,动物合格证号 No.370726251101128982。小鼠饲养于温度 20~26 °C,相对湿度 45%~65%,12 h 明暗循环的环境中,自由进食饮水。小鼠适应性饲养 7 d 后开始正式实验。动物实验经鲁南制药集团新药中心药理学伦理委员会批准(批准号 HN-IACUC-2024-124)。

1.2 药品与试剂

SHTB(国药准字 Z20150041,批号 26210483)由鲁南厚普制药有限公司提供;盐酸氟西汀(批号 H20123161)购自山东力诺制药有限公司;光敏剂玫瑰红粉末(批号 632-69-9)购自美国 Sigma 公司;5-HT(批号 153-98-0)、谷氨酸(glutamate, Glu,批号 56-86-0)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE,批号 51-41-2)、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色液(批号 H0809)购自北京索莱宝科技有限公司;GABA(批号 56-12-2)、DA(批号 59-92-7)、色氨酸(批号 73-22-3)、氨苄西林(批号 A9518)、新霉素(批号 N6386)、万古霉素(批号 V2002)、甲硝唑(批号 M1547)购自美国默克公司;小鼠 IL-1 β 、IL-10、LPS、IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒(批号分别为 SEA563Mu、HEA056Mu、HEA079Mu、CEB526Ge、SEA133Mu)购自武汉云克隆科技股份有限公司;BeyoECL Moon 极超敏 ECL 化学发光试剂盒(批号 P0018FS)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(批号 A0216)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 A0208)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;

NF- κ B、p-NF- κ B、TLR4、MyD88、 β -actin、离子钙结合适配分子 1(ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、Claudin-1 和 Occludin 抗体(货号分别为 ab32536、ab76302、ab22048、ab2064、ab8224、ab178847、ab68428、ab180158、ab216327)购自英国 Abcam 公司;DNA 浓度检测试剂盒(货号 Q32851)购自美国 Thermo 公司。

1.3 仪器

LGY-20 型双光纤 LED 冷光源(北京华兴瑞安科技有限公司);透射电子显微镜(日本 HITACHI 公司);Z326K 型高速冷冻离心机(德国 Hermle 公司);IM-5FLD 型倒置荧光显微镜(意大利 Optika 公司);Chemi Scope6200 型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);DYY-6D 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Multiskan GO 型酶标仪、VanquishNeo 型高效液相色谱仪、Orbitrap Astral 型质谱仪(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

56 只 ICR 小鼠随机分为假手术组、脑缺血(PT)组、PSD 组、氟西汀(20 mg/kg)组和 SHTB 低、中、高剂量(100、200、400 mg/kg,分别相当于临床等效剂量的 0.25、0.50、1.00 倍)^[18]组,每组 8 只。小鼠经盐酸赛拉嗪和盐酸氯胺酮麻醉后,尾 iv 玫瑰红溶液(30 mg/kg),采用 530~560 nm 冷光局部照射颅脑 40 min 诱导建立脑缺血模型^[19]。假手术组尾 iv 玫瑰红溶液,开颅暴露 40 min 后缝合,不予冷光照射。PSD 组和各给药组小鼠进一步接受 21 d CUMS,应激方式包括随机的食物或水剥夺、昼夜颠倒、热暴露、湿垫料、倾斜笼位、噪音刺激等^[20]。每日应激刺激后,各给药组小鼠 ig 相应药物(10 mL/kg),假手术组、PT 组和 PSD 组 ig 等体积的水,1 次/d,连续给药 21 d。

2.2 行为学测试

给药结束后,进行行为学测试。悬尾试验(tail suspension test, TST)用于评估抑郁样行为,记录小鼠悬挂 6 min 内的最后 4 min 不动时间^[21]。高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)实验通过记录小鼠在开放臂与封闭臂的进入次数及停留时间百分比,以评估焦虑样行为^[22]。蔗糖偏好实验(sucrose preference test, SPT)则先使小鼠适应单独饲养,并自由摄取 1%蔗糖溶液与纯水 48 h,随后记录其 2 h

内的蔗糖偏好指数^[23]。旷场实验 (open field test, OFT) 在 40×40×40 cm 的装置中进行, 记录小鼠 8 min 内的总移动距离与中心区域停留时间, 以评估其自主探索与焦虑状态^[24]。

2.3 脑组织病理及超微结构观察

取脑组织, 固定、包埋后切成 5 μm 石蜡切片, 切片经脱蜡、水化后进行 HE 染色, 于显微镜下观察并拍照^[25]。取海马组织, 采用 2.5%戊二醛及 1% 四氧化锇固定, 经梯度乙醇脱水、树脂包埋后切成 50~70 nm 超薄切片, 于透射电镜下观察并拍照^[26]。

2.4 免疫荧光检测脑组织 Iba1 及 GFAP 表达

取脑组织 5 μm 石蜡切片, 经抗原修复及 0.3% Triton X-100 通透后, 用 5% 山羊血清于室温封闭 1 h, 随后于 4 °C 下与一抗 (Iba1、GFAP) 孵育过夜。复温后, 与相应的荧光标记二抗于室温避光孵育 1 h。使用 DAPI 对细胞核进行复染, 封片后于激光共聚焦显微镜下采集图像, 并使用 Image J 软件对 Iba1 及 GFAP 的荧光强度进行定量分析, 以评估小胶质细胞与星形胶质细胞的活化状态。

2.5 血清及脑组织中炎症因子水平的检测

实验结束后, 对小鼠进行腹主动脉采血, 采集全血置于离心管中静置待其自然凝固后, 使用离心机以 3 500 r/min 离心 15 min, 小心吸取上层淡黄色液体, 分离得到血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清及脑组织中 LPS、IL-1β、IL-6、IL-10、TNF-α 水平。

2.6 Western blotting 检测前额叶皮层中 TLR4、MyD88、p-NF-κB、NF-κB 及肠组织中 Occludin、Claudin-1 蛋白表达

取前额叶皮层组织及肠组织, 加入裂解液匀浆裂解后, 离心提取蛋白。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, 分别孵育一抗和二抗, 洗涤后加入 ECL 化学发光试剂显影, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.7 脑组织中神经递质水平的检测

采用 LC-MS 定量分析脑组织中 5-HT、Glu、GABA、NE、DA、色氨酸水平^[27]。

2.7.1 样品处理 取前额组织样本, 置于冰上, 4 °C、4 000×g 离心 10 min, 取 50 μL 上清液, 加入甲醇-乙腈-水溶液 (2:2:1), 涡旋混匀后以 4 °C、9 100×g 离心 10 min, 取 2 μL 上清液, 进行 LC-MS/MS 分析。

2.7.2 色谱条件 采用 Waters CORTECS UPLC

HILIC 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.6 μm); 流动相为 5 mmol/L 甲酸铵-0.1%甲酸水溶液 (A), 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~1.0 min, 95% B; 1.0~8.0 min, 95%~70% B; 8.0~9.0 min, 70% B; 9.0~9.1 min, 70%~95% B; 9.1~12.0 min, 95% B; 柱温 35 °C; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量 2 μL。

2.7.3 质谱条件 采用 AB SCIEX-5500 质谱仪, 离子化源为加热电喷雾电离源 (heated electrospray ionization source, H-ESI), 采用正离子检测模式, 离子化电压 3 500 V, 鞘气、雾化气、尾气体积流量分别为 35、5、0 arb, 离子传输管温度 325 °C, 气化温度 200 °C。

2.8 网络药理学分析

采用 TCMS 数据库 (<https://tcmspw.com/tcmsp.php>), 以口服生物利用度≥30%、类药性≥0.18 为标准, 收集 SHTB 的活性成分; 采用 SwissTarget Prediction 数据库 (<https://www.swisstargetprediction.ch/>) 预测 SHTB 活性成分的潜在靶点。通过 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>) 数据库获取 PSD 相关靶点。使用 VENNY 2.1 筛选 SHTB 活性成分与 PSD 的交集靶点, 利用 STRING 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 通过 Cytoscape 软件进行可视化。使用 DAVID 6.8 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及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 ($P<0.05$)。

2.9 非靶向代谢组学分析

分别取 5 mg 粪便或前额叶皮层组织样本, 加入甲醇-水 (3:1) 进行充分涡旋振荡与低温超声提取, 随后离心取上清用于检测。样品经超高效液相色谱-高分辨质谱 (UPLC-HRMS) 系统进行分离与检测。原始数据经峰提取、对齐与归一化处理, 采用 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析 (principal components analysis, PCA) 及正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA), 并结合变量重要性投影值及统计学检验筛选差异代谢物^[28]。

2.10 肠道菌群分析

通过 16S rDNA 高通量测序分析肠道菌群组成及多样性。提取粪便样本总 DNA 后, 扩增细菌 16S rRNA 基因特定可变区并进行测序。原始序列数据

经质量控制后,采用 DADA2 或 Deblur 方法进行去噪处理以获得扩增子序列变体 (amplicon sequence variants, ASV), 随后进行物种分类注释、多样性分析及基于数据库的功能预测分析。

2.11 脑组织蛋白组学分析

脑组织蛋白组学用于系统分析脑组织蛋白表达谱变化。取前额叶皮层组织,加入 RIPA 裂解液充分匀浆裂解,离心收集上清,并采用 BCA 法进行蛋白定量。等量蛋白经酶解处理后,使用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 系统进行检测与鉴定,通过数据库比对与生物信息学分析筛选差异表达蛋白^[29]。

2.12 抗生素介导的肠道菌群清除实验

为验证 SHTB 的作用是否依赖于肠道菌群,进一步采用广谱抗生素耗竭小鼠模型进行验证^[30]。48 只 ICR 小鼠随机分为假手术组、假手术+抗生素组、PSD 组、PSD+抗生素组、SHTB (200 mg/kg) 组和 SHTB (200 mg/kg) + 抗生素组,每组 8 只。按“2.1”项下方法造模及给药,在造模开始前 7 d,小鼠每日 ig 广谱抗生素混合溶液 (氨苄西林 1 g/L、

新霉素 1 g/L、万古霉素 0.5 g/L、甲硝唑 1 g/L), 造模直至实验结束自由饮用广谱抗生素混合溶液以维持菌群耗竭状态。为改善适口性,抗生素溶液中加入适量蔗糖。给药 21 d 后,进行行为学测试。收集脑组织进行 HE 染色,观察组织病理变化。收集假手术组和假手术+抗生素组小鼠粪便样本,测定 DNA 浓度。

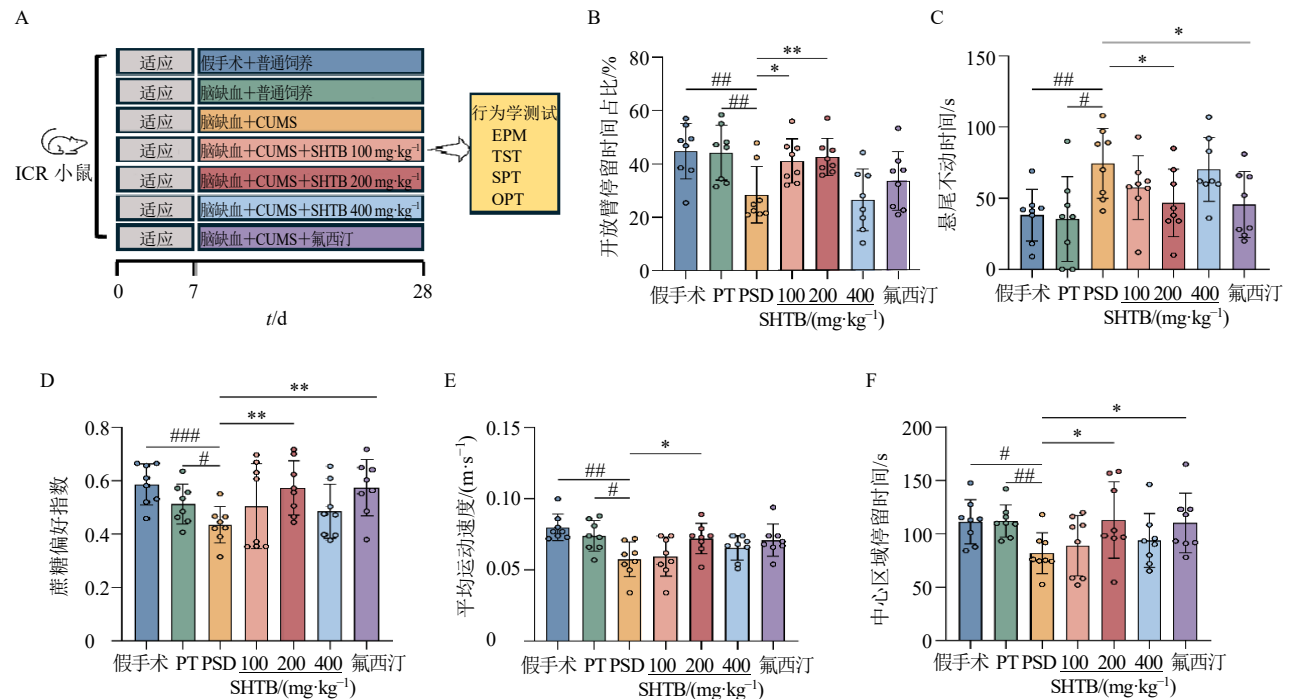
2.13 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析,使用 Shapiro-Wilk 检验评估数据的正态性,并用 Levene's 检验确定方差齐性。对于两组间的比较,采用独立样本 *t* 检验;多组间的差异则使用单因素或双因素 ANOVA,并结合 Tukey 事后检验进行多重比较。肠道菌群与代谢物之间的相关性通过 Spearman 相关分析评估。

3 结果

3.1 SHTB 改善 PSD 小鼠的抑郁样行为

实验结束后进行行为学测试 (图 1-A)。EPM 实验结果 (图 1-B) 显示,与假手术组比较,PSD 组小



A-实验设计与分组示意图; B-EPM 实验中小鼠在开放臂停留时间占比; C-TST 中小鼠不动时间; D-SPT 中小鼠蔗糖偏好指数; E-OFT 中小鼠平均运动速度; F-OFT 中小鼠在中心区域停留时间; 与假手术组或 PT 组比较: **P* < 0.05 ###*P* < 0.01 ####*P* < 0.001; 与 PSD 组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01, 下同。

A-schematic of experimental design and grouping; B-percentage of time spent in open arms in EPM test; C-immobility time in TST; D-sucrose preference index in SPT; E-average locomotor speed in OFT; F-time spent in central zone in OFT; **P* < 0.05 ###*P* < 0.01 ####*P* < 0.001 vs sham group or PT group; **P* < 0.05 ***P* < 0.01 vs PSD group, same as below figures.

图 1 SHTB 对 PSD 小鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of SHTB on behavior of PSD mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

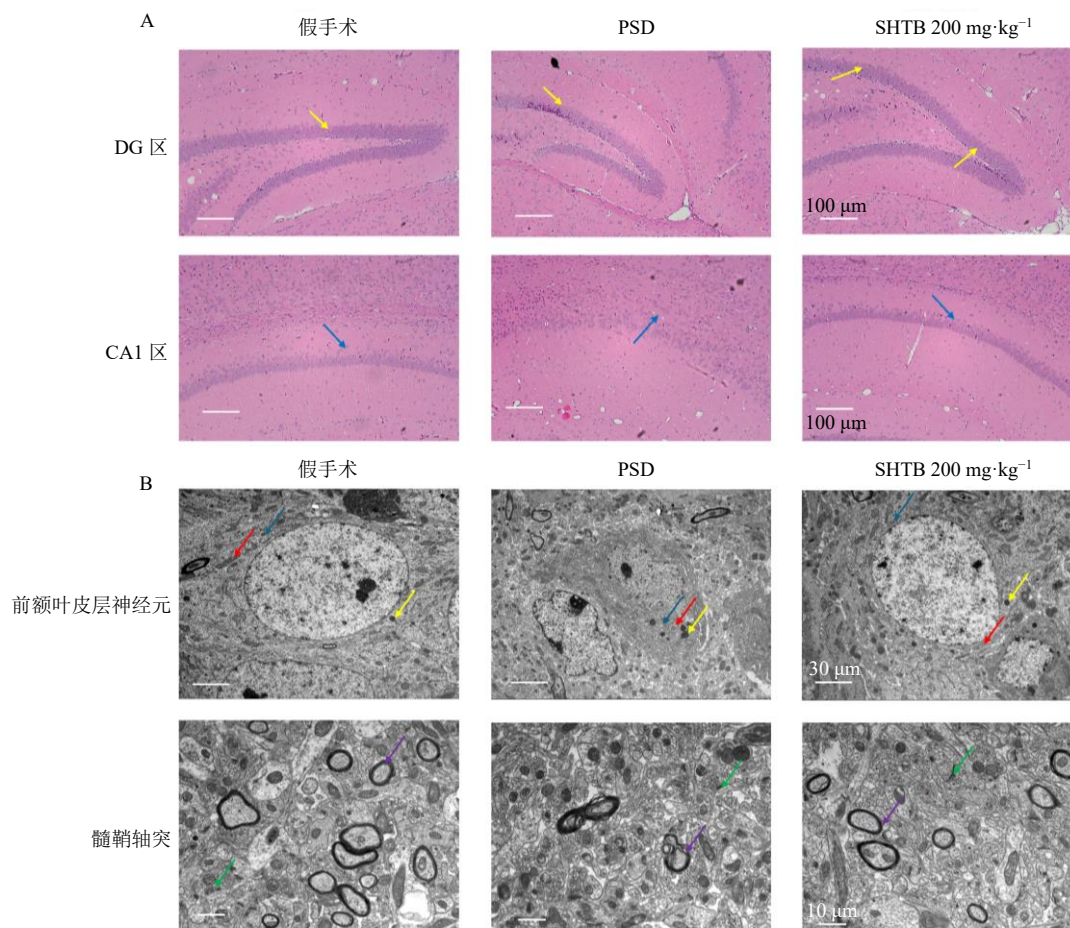
鼠在开放臂停留时间占比显著降低 ($P < 0.01$); 与 PSD 组比较, SHTB 低、中剂量组小鼠在开放臂停留时间占比显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。TST 结果 (图 1-C) 显示, 与假手术组比较, PSD 组小鼠的不动时间显著延长 ($P < 0.01$); 与 PSD 组比较, SHTB 中剂量组和氟西汀组小鼠不动时间显著缩短 ($P < 0.05$)。SPT 结果 (图 1-D) 显示, 与假手术组比较, PSD 组小鼠蔗糖偏好指数显著降低 ($P < 0.001$); 与 PSD 组比较, SHTB 中剂量组和氟西汀组小鼠蔗糖偏好指数显著升高 ($P < 0.01$)。OFT 结果 (图 1-E、F) 显示, 与假手术组比较, PSD 组小鼠的平均运动速度和中心区域停留时间均显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与 PSD 组比较, SHTB 中剂量组小鼠的平均运动速度和中心区域停留时间显著增加 ($P < 0.05$), 氟西汀组小鼠的

中心区域停留时间显著增加 ($P < 0.05$)。

3.2 SHTB 改善 PSD 小鼠脑组织的组织学和超微结构完整性

为评估 SHTB 对脑组织形态学的神经保护作用, 对各组小鼠海马组织进行 HE 染色和透射电镜观察。HE 染色结果 (图 2-A) 显示, 假手术组神经元结构完整, 核大且圆, 核仁清晰; PSD 组则出现核固缩、排列紊乱、细胞溶解和炎症浸润等明显病理改变; 经 SHTB 干预后, 以上病理变化得到明显改善, 神经元排列更整齐, 炎症浸润减少, 细胞结构得以保存。

透射电镜结果 (图 2-B) 显示, 假手术组神经元超微结构基本正常, 细胞核圆润, 核膜完整, 形态未见明显异常; 胞质中线粒体数量尚可, 外膜结



A-海马切片的 HE 染色 ($\times 100$), 黄色箭头表示 DG 区核固缩情况, 蓝色箭头表示 CA1 区排列情况; B-前额叶皮层神经元和髓鞘轴突的 TEM 图像 ($\times 1000$), 红色箭头表示线粒体, 黄色箭头表示溶酶体, 蓝色箭头表示内质网, 绿色箭头表示突触, 紫色箭头表示髓鞘结构。

A-HE staining of hippocampal sections ($\times 100$), yellow arrows indicate nuclear pyknosis in DG region, and blue arrows indicate the neuronal arrangement in CA1 region; B-TEM images of prefrontal cortex neurons and myelinated axons ($\times 1000$), red arrows indicate mitochondria, yellow arrows indicate lysosomes, blue arrows indicate endoplasmic reticulum, green arrows indicate synapses, and purple arrows indicate myelin sheath structures.

图 2 SHTB 对 PSD 小鼠脑组织病理及超微结构变化的影响

Fig. 2 Effect of SHTB on pathological and ultrastructural changes of brain tissue in PSD mice

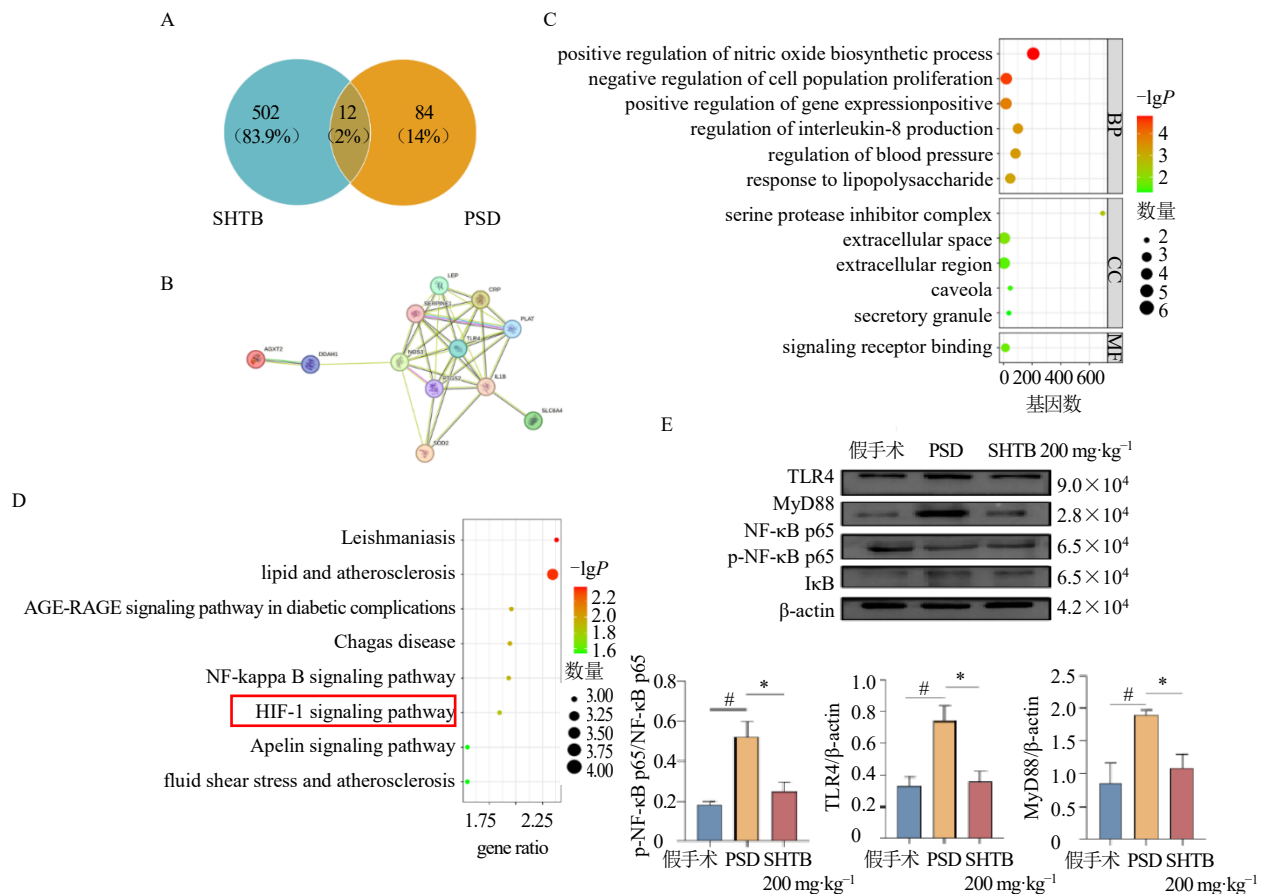
构基本清晰，嵴结构完整且数量丰富，整体形态较为正常；内质网数量丰富，未见明显肿胀；偶见溶酶体；突触数量丰富，突触间隙未见增宽，突触小泡丰富，突触后致密区结构清晰；髓鞘形态正常，排列规则、致密。与假手术组比较，PSD组神经元超微结构出现显著异常，神经元明显皱缩，细胞核形态不规则，胞质电子密度升高；线粒体数量丰富，但多呈皱缩、体积减小，外膜界限不清，嵴明显肿胀，膜电子密度升高；内质网数量丰富并伴有不同程度肿胀；溶酶体数量较少；突触数量明显减少，突触前后膜界限模糊，突触后致密区电子密度降低；部分区域可见脱髓鞘改变，髓鞘结构紊乱、排列疏松，局灶性脱落或消失。经SHTB干预后，神经元超微结构损伤明显改善，神经元细胞核形态较为圆润，胞质电子密度趋于正常；线粒体数量尚可，形态基本恢复，外膜较清晰，嵴结构完整，仅见轻

度肿胀，排列相对规则；内质网数量丰富，未见明显肿胀；偶见溶酶体；突触数量较 PSD 组明显增多，突触结构清晰，突触间隙正常，突触小泡丰富，突触后致密区未见明显异常；髓鞘结构完整，排列致密有序，脱髓鞘现象显著减轻。

综上，SHTB可减轻PSD小鼠的组织学与超微结构损伤，发挥神经保护作用，维持神经元完整性及组织微环境稳态。

3.3 网络药理学分析与实验证实 TLR4/NF-κB 通路参与 SHTB 的抗抑郁作用

为探究 SHTB 对 PSD 治疗作用的潜在分子机制，将网络药理学与实验验证相结合，系统解析其相关信号通路以及在体内的生物学效应。Venn 分析筛选出 SHTB 活性成分与 PSD 相关靶点之间的 12 个交叉靶点（图 3-A）。PPI 网络分析显示，这些靶点主要参与炎症相关通路（图 3-B）。GO 富集分析



A-SHTB 活性成分与 PSD 靶点的 Venn 图；B-交集靶点的 PPI 网络；C-GO 富集分析；D-KEGG 通路富集分析；E-Western blotting 检测前额叶皮层中 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路相关蛋白表达 (n = 3)。

A-Venn diagram of targets of SHTB active ingredients and PSD; B-PPI network of intersection targets; C-GO enrichment analysis; D-KEGG pathway enrichment analysis; E-expressions of TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway related proteins in prefrontal cortex detected by Western blotting (n = 3).

图 3 SHTB 抗 PSD 机制的网络药理学预测及实验验证

Fig. 3 Network pharmacology prediction and experimental validation of anti-PSD mechanism of SHTB

结果显示,潜在作用靶点在生物过程层面主要富集于一氧化氮生物合成过程的正向调控、细胞群体增殖的负向调控以及基因表达的正向调控等过程;在细胞组分层面上,相关靶点主要分布于细胞外空间、细胞外区域及丝氨酸蛋白酶抑制剂复合物等;在分子功能层面上,靶点主要富集于信号受体结合功能,提示该网络可能通过调控炎症反应、免疫相关信号及细胞外信息传递过程发挥潜在作用(图 3-C)。KEGG 分析进一步显示 NF- κ B 信号通路可能是 SHTB 发挥抗抑郁作用的关键(图 3-D)。

为验证预测结果,通过 Western blotting 检测前额叶皮层中 NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达。结果(图 3-E)显示,与假手术组比较,PSD 组小鼠前额叶皮层中 TLR4、MyD88 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),提示 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路被激活;与 PSD 组比较,TLR4、MyD88 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),表明 SHTB 可能通过抑制该炎症通路减轻 PSD 相关神经炎症。

3.4 SHTB 缓解 PSD 小鼠的神经炎症、胶质细胞激活及肠屏障损伤

为评估 SHTB 对神经炎症的影响,检测了小鼠脑组织和血清中的炎症细胞因子的水平。如图 4-A 所示,与假手术组比较,PSD 组小鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 及 LPS 水平均显著升高($P < 0.05$ 、 0.01),而 IL-10 水平显著降低($P < 0.05$),提示 PSD 模型成功诱导了明显的外周炎症反应;与 PSD 组比较,各给药组血清中 IL-1 β 水平显著降低($P < 0.05$),SHTB 中、高剂量组和氟西汀组血清中 LPS 及 TNF- α 水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01),SHTB 中剂量组和氟西汀组血清中 IL-6 水平显著降低($P < 0.05$),SHTB 中剂量组和氟西汀组血清中 IL-10 水平显著升高($P < 0.01$)。如图 4-B 所示,与假手术组比较,PSD 组小鼠脑组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 及 LPS 水平均显著升高($P < 0.05$ 、 0.01),而 IL-10 水平显著降低($P < 0.01$),表明 PSD 小鼠存在明显的中枢神经炎症反应;与 PSD 组比较,SHTB 中、高剂量组和氟西汀组脑组织中 IL-1 β 水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01),SHTB 低、中剂量组和氟西汀组脑组织中 LPS 及 TNF- α 水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01),SHTB 中剂量组和氟西汀组脑组织中 IL-6 水平显著降低($P < 0.05$),SHTB 低、中剂量组和氟西汀组脑组织中 IL-10 水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.01)。表明 SHTB 可

同时缓解 PSD 小鼠的外周及中枢炎症反应,显著逆转促炎/抗炎因子失衡状态。

通过免疫荧光检测海马区胶质细胞活化情况,如图 4-C 所示,与假手术组比较,PSD 组海马组织中 Iba1 和 GFAP 表达显著增加($P < 0.05$),表明小胶质细胞和星形胶质细胞显著激活;而 SHTB 明显抑制其过度活化($P < 0.05$)。此外,通过 Western blotting 检测结肠组织紧密连接蛋白表达评估肠道屏障功能。如图 4-D 所示,与假手术组比较,PSD 组小鼠结肠组织 Claudin-1 和 Occludin 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01);而 SHTB 可显著上调 Claudin-1 和 Occludin 表达($P < 0.05$ 、 0.01),表明 SHTB 有助于维持肠道屏障完整性。

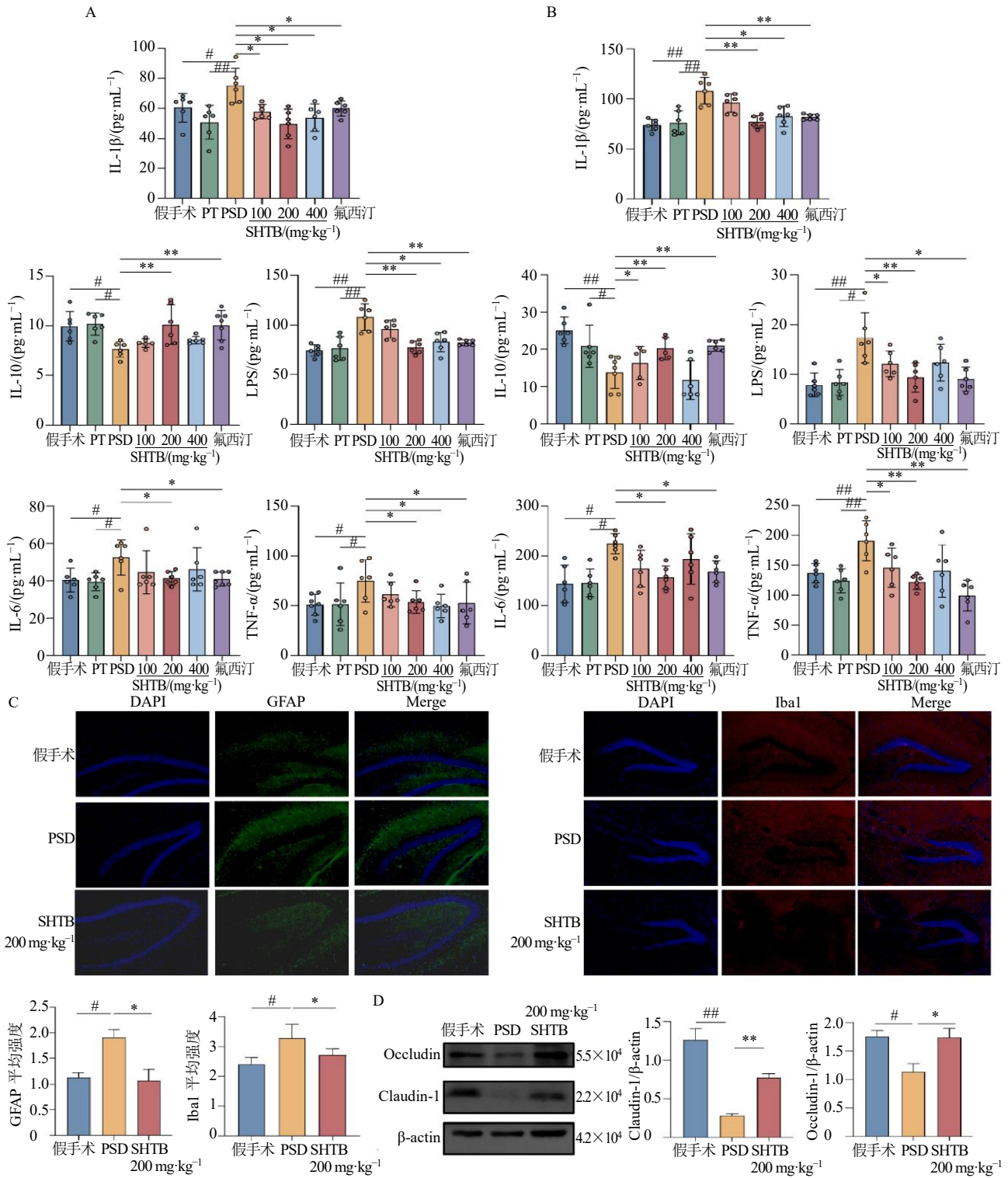
上述结果表明,SHTBM 可通过协同调控外周及中枢炎症反应、抑制神经炎症并改善肠道屏障功能,从而发挥潜在的保护作用。

3.5 SHTB 改善 PSD 小鼠的代谢紊乱

为进一步阐明 SHTB 在 PSD 小鼠中的系统性代谢调控作用,对粪便和脑组织进行非靶向代谢组学分析。主成分分析(principle component analysis, PCA)结果显示,在正、负离子模式下,假手术组、PSD 组和 SHTB 中剂量组粪便样本和脑组织样本均呈现明显分离(图 5-A、6-A);SHTB 组与假手术组聚类更为接近,提示 SHTB 将 PSD 小鼠代谢状态部分恢复至正常水平。粪便和脑代谢组的正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)模型均表现出良好的拟合度($R^2 > 0.9$)和预测能力(良好 Q^2 值),置换检验排除了过拟合(图 5-A、6-A)。

在粪便代谢组中,根据变量权重值(variable importance for projection, VIP) > 1 且 $P < 0.05$,共分析鉴定出 59 种差异代谢物,热图(图 5-B)显示,与假手术组比较,PSD 引起 42 种代谢物表达显著下调、17 种代谢物表达显著上调,而 SHTB 显著逆转了这些代谢物的异常表达。差异代谢物的通路富集结果(图 5-C)显示,丁酸代谢、色氨酸代谢和初级胆汁酸生物合成显著参与了 SHTB 对粪便代谢物的调节作用。

在脑代谢组中,与假手术组比较,有 20 个代谢物在 PSD 中显著改变(VIP > 1 且 $P < 0.05$),热图(图 6-B)显示,与假手术组比较,PSD 引起 14 种代谢物表达显著下调、6 种代谢物表达显著上调,而 SHTB 显著逆转了这些代谢物的异常表达。差异

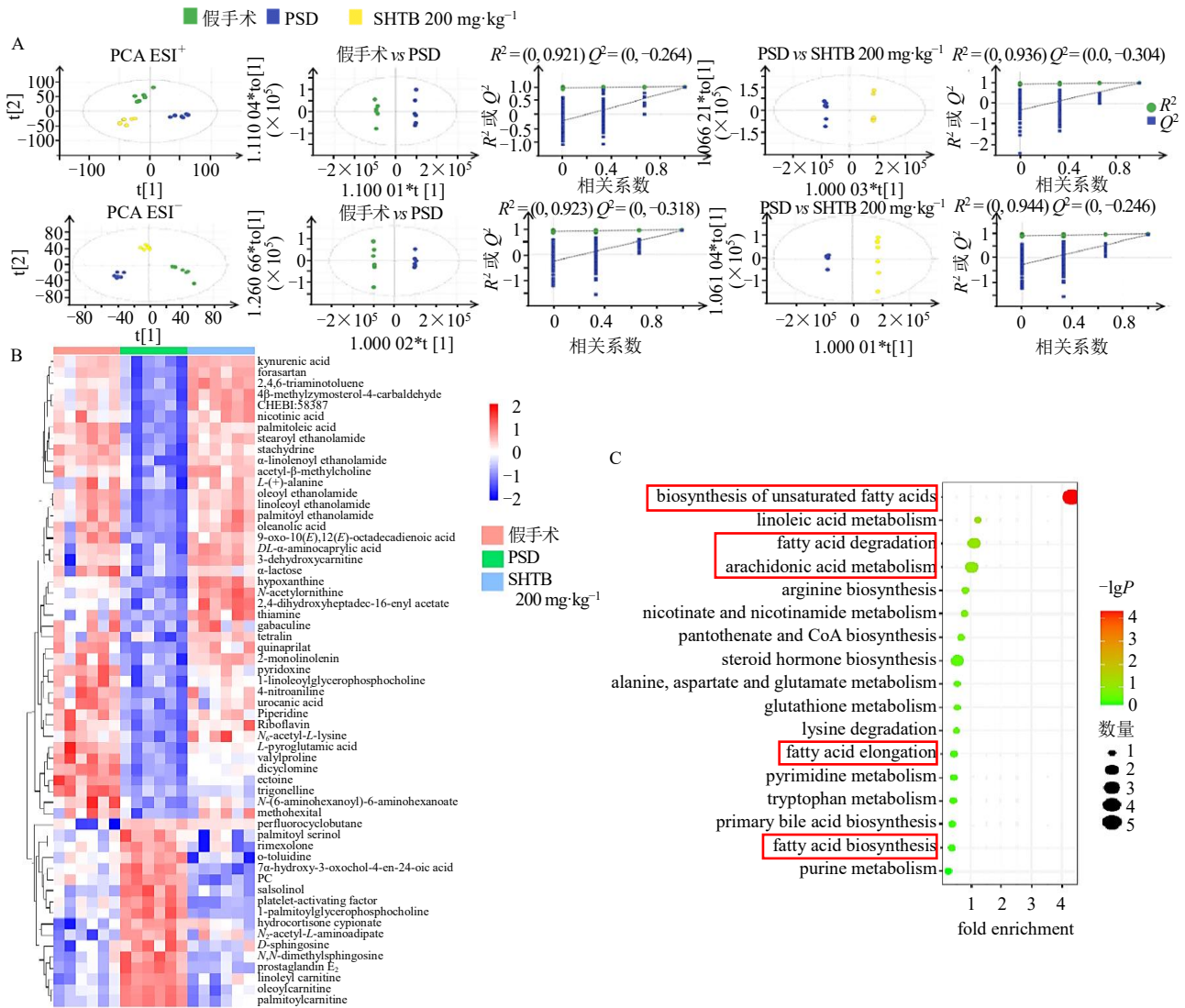


A-血清中炎症细胞因子水平; B-脑组织中炎症细胞因子水平; C-免疫荧光检测海马区 Iba1 和 GFAP 的表达 ($\times 100$); D-Western blotting 检测结肠组织 Claudin-1 和 Occludin 的蛋白表达。

A-levels of inflammatory cytokines in serum; B-levels of inflammatory cytokines in brain tissue; C-expressions of Iba1 and GFAP in hippocampus detected by immunofluorescence ($\times 100$); D-expressions of Claudin-1 and Occludin protein in colon tissue detected by Western blotting.

图 4 SHTB 干预缓解 PSD 小鼠的神经炎症、胶质细胞活化及肠道屏障功能障碍 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 SHTB intervention alleviates neuroinflammation, glial cell activation, and intestinal barrier dysfunction in PSD mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-PCA 和 OPLS-DA 得分图；B-各组代表性差异代谢物的热图；C-差异代谢物的 KEGG 通路富集分析，图 6 同。

A-PCA and OPLS-DA score plots; B-heatmap of representative differential metabolites in feces across groups; C-KEGG pathway enrichment analysis of differential metabolites, same as Fig. 6.

图 5 粪便样本的非靶向代谢组学分析

Fig. 5 Non-targeted metabolomic analysis of fecal samples

代谢物的通路富集结果 (图 6-C) 显示, SHTB 调节脑组织代谢异常涉及的相关通路主要包括鞘脂代谢、甘油磷脂代谢和花生四烯酸代谢, 这些通路与神经炎症、细胞膜完整性和突触功能密切相关。

在粪便代谢组和脑组织代谢组的通路富集分析中, 均观察到脂质代谢相关通路的显著改变。不饱和脂肪酸的生物合成、花生四烯酸代谢以及脂肪酸的合成、延长与降解等通路在 2 种样本中均被共同富集, 提示 PSD 引起的代谢改变在外周 (粪便) 与中枢 (脑组织) 层面呈现出高度一致的脂肪酸代谢重塑特征, 脂质代谢相关通路可能在不同生理层面同时受到影响。以上结果表明, SHTB 的抗抑郁

作用至少部分依赖其对肠道和脑部代谢紊乱尤其是脂质代谢的双向调节, 提示其具有系统性代谢重塑能力。

3.6 SHTB 恢复 PSD 小鼠的肠道微生物多样性与结构

为探究 SHTB 对 PSD 小鼠肠道菌群的调节作用, 首先分析了各组 α 多样性指数, 结果如图 7-A 所示, 与假手术组比较, PSD 组 ACE 及 Shannon 指数显著下降 ($P < 0.05, 0.01$), 而 Simpson 指数显著升高 ($P < 0.01$), 提示其微生物丰富度及均匀度降低; 与 PSD 组比较, SHTB 干预后显著改善了上述指标 ($P < 0.05$)。

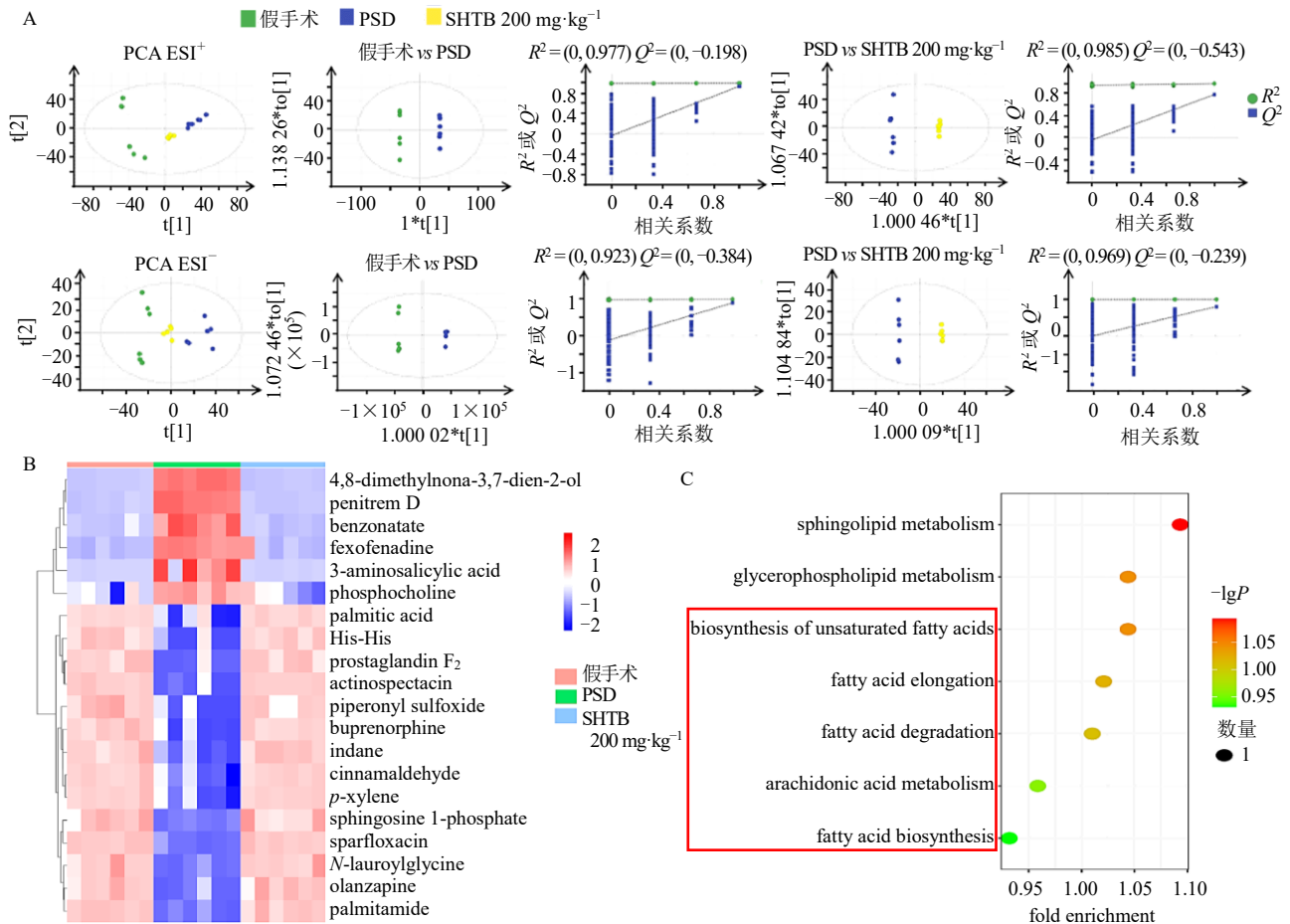


图 6 脑组织样本的非靶向代谢组学分析

Fig. 6 Non-targeted metabolomic analysis of brain tissue samples

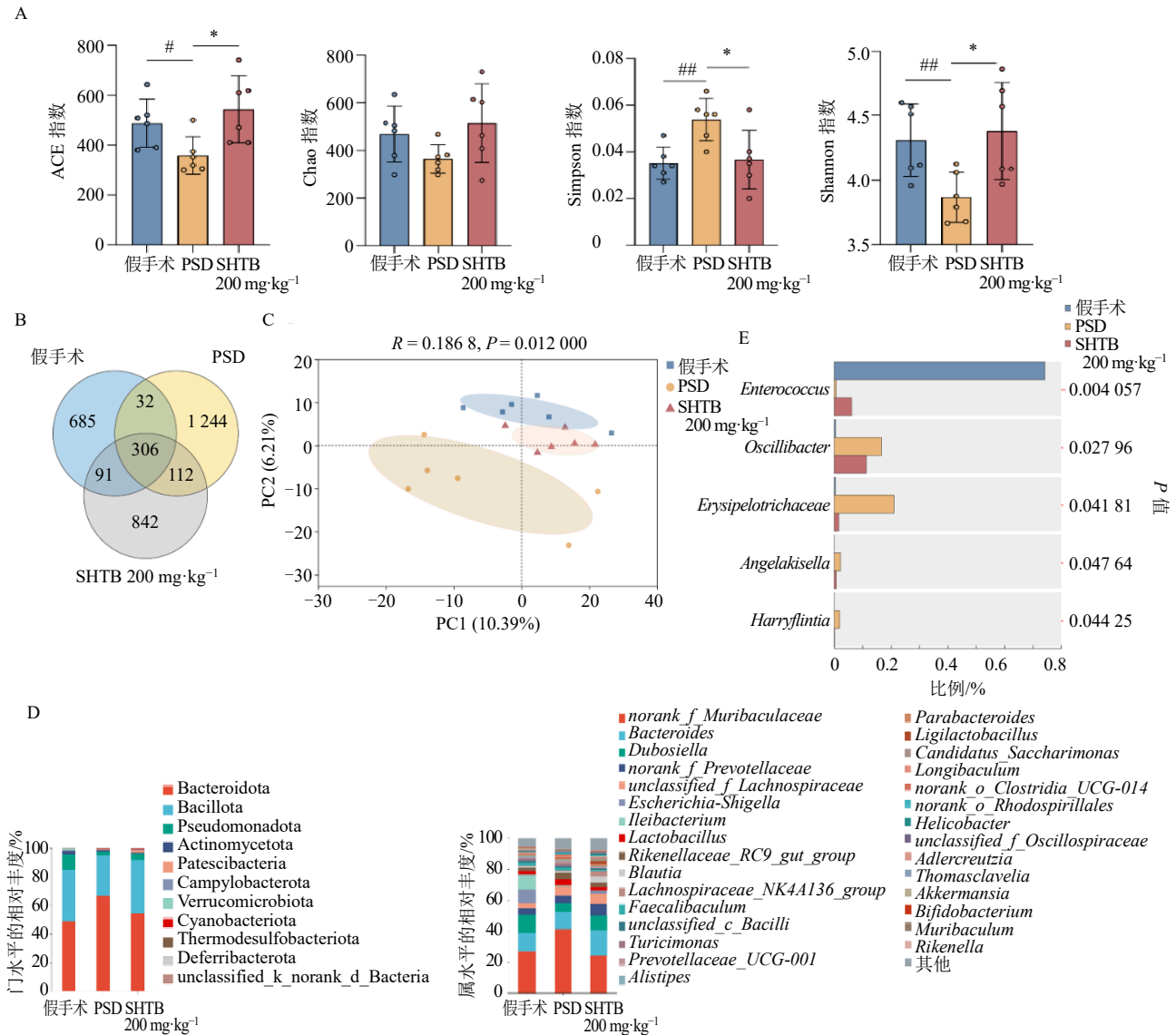
Venn 图 (图 7-B) 分析显示 3 组间存在共同与特有的 ASV, 与假手术组相比, PSD 组呈现出显著的菌群组成改变, 其特有 ASV 数量增加至 1 244 个, 而假手术组特有 ASV 为 685 个, 提示 PSD 状态下肠道菌群发生明显重塑。在菌群恢复相关分析中, 假手术组与 SHTB 组之间共有但在 PSD 组中缺失的 ASV 为 91 个, 表明 SHTB 干预能够恢复部分在 PSD 状态下丢失的正常菌群组成。值得注意的是, SHTB 组仍保留 842 个特有 ASV, 显示 SHTB 处理在恢复正常菌群结构的同时, 也可能形成具有干预特征的特异菌群谱。这些结果表明 SHTB 干预可在一定程度上逆转 PSD 诱导的菌群丢失, 部分恢复与健康状态相关的微生物多样性, 但并未完全回归至假手术组水平。基于 ASV 水平的 PCA 结果 (图 7-C) 显示, 假手术组、PSD 组和 SHTB 组之间分离明显, 其中 SHTB 组的聚类位置更接近假手术组, 同样说明 SHTB 能够重建肠道菌群结构。

分类学分析进一步揭示 PSD 小鼠在门水平和

属水平均存在显著改变。如图 7-D 所示, 在门水平上, PSD 小鼠的拟杆菌门 (Bacteroidota) 相对丰度增加, 而厚壁菌门 (Firmicutes) 相对丰度减少, 导致 F/B 值紊乱; SHTB 可部分纠正 F/B 值失衡。利用 Kruskal-Wallis H 检验的属水平分析 (图 7-E) 显示, 包括肠球菌属 *Enterococcus*、颤螺菌属 *Oscillibacter*、丹毒丝菌科 *Erysipelotrichaceae*、*Angelakisella* 和哈尼夫菌 *Harryflintia* 在内的关键菌属均存在显著组间差异 ($P < 0.05, 0.01$), SHTB 能够显著改善上述关键菌属的失调。

以上结果表明 SHTB 可有效恢复肠道微生物多样性、纠正菌群失调, 并抑制致病菌过度生长, 从而促进健康肠道微生态的重建。

为进一步探索肠道菌群与宿主代谢之间的功能联系, 对肠道微生物与脑组织及粪便代谢物进行 Spearman 相关性分析 (图 8)。结果显示, 特定菌属与多种代谢物存在显著的正或负相关关系。*Enterococcus* 与多种神经保护相关代谢物呈正相关,



A- α -多样性指数; B-各组共享和特有 ASV 的韦恩图; C-基于 ASV 水平的 PCA 得分图; D-门和属水平的分类组成分析; E-关键属的差异分析, 通过 Kruskal-Wallis H 检验显示各组显著差异, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

A- α -diversity indices; B-Venn diagram of shared and unique ASVs among groups; C-PCA score plot at ASV level; D-taxonomic composition at phylum and genus levels; E-key genera identified by Kruskal-Wallis H test, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

图 7 SHTB 恢复 PSD 小鼠肠道菌群多样性和组成 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 SHTB restores gut microbiota diversity and composition in PSD mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

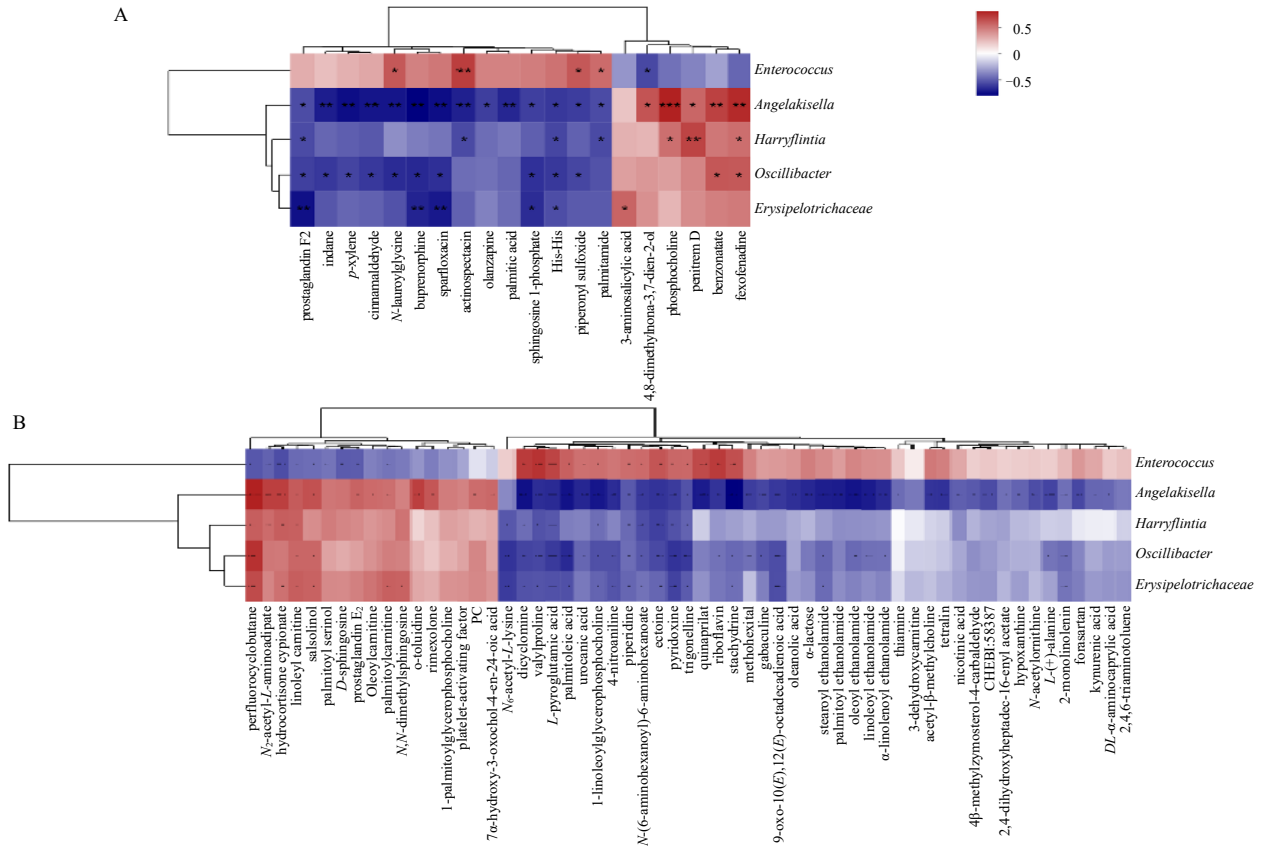
提示其在维持宿主稳态与代谢平衡中可能发挥关键作用; 相反, *Oscillibacter*、*Angelakisella*、*Harryflintia* 和 *Erysipelotrichaceae* 与神经毒性或促炎代谢物呈正相关, 提示其可能参与代谢应激和神经炎症过程。

3.7 SHTB 通过蛋白质组学揭示的通路恢复 PSD 小鼠的神经递质稳态

为探究 SHTB 对 PSD 小鼠的抗抑郁分子机制, 对前额叶皮层进行蛋白质组学分析。火山图 (图 9-

A) 显示, 与假手术组相比, PSD 组中 402 个蛋白上调、352 个蛋白下调; SHTB 干预后, 与 PSD 组相比, 共有 314 个蛋白显著上调、468 个蛋白显著下调, 表明 SHTB 可部分逆转 PSD 相关的蛋白表达变化。层次聚类热图分析进一步显示, SHTB 组的蛋白表达谱更接近假手术组 (图 9-B)。

KEGG 富集分析显示差异表达蛋白显著富集于多条神经递质相关通路, 包括 5-羟色胺能突触、GABA 能突触、谷氨酸能突触、内源性大麻素逆行



A-关键肠道微生物属与脑组织中差异代谢物的 Spearman 相关性热图；B-关键肠道微生物属与粪便样本中差异代谢物的 Spearman 相关性热图，红色表示正相关，蓝色表示负相关。

A-Spearman correlation heatmap between key gut microbial genera and differential metabolites in brain tissue; B-Spearman correlation heatmap between key gut microbial genera and differential metabolites in fecal samples, red indicates positive correlation, blue indicates negative correlation.

图 8 肠道菌群与差异代谢物相关性分析

Fig. 8 Correlation analysis between gut microbiota and differential metabolites

信号传导、长时程抑制及昼夜节律调控等(图 9-C)。这些通路与突触可塑性及神经精神调控密切相关，是 PSD 发生发展的关键机制，也是抗抑郁干预的重要靶点。

为验证蛋白组结果，利用 LC-MS 对前额叶皮层中的 6 种关键神经递质 5-HT、GABA、Glu、DA、NE、色氨酸进行定量分析。如图 9-D 所示，与假手术组相比，PSD 组小鼠前额叶皮层中 5-HT、DA、NE 和色氨酸水平显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)，GABA 也出现了下降，而 Glu 水平显著升高 ($P < 0.05$)，提示兴奋性与抑制性递质的表达量出现了严重失衡。与 PSD 组比较，SHTB 低剂量组 NE 水平显著升高 ($P < 0.05$)，Glu 水平显著降低 ($P < 0.05$)；SHTB 中剂量组小鼠前额叶皮层中 5-HT、GABA、DA 和 NE 水平显著升高 ($P < 0.05$)，Glu 水平显著降低 ($P < 0.05$)，色氨酸水平呈升高趋势；SHTB 高

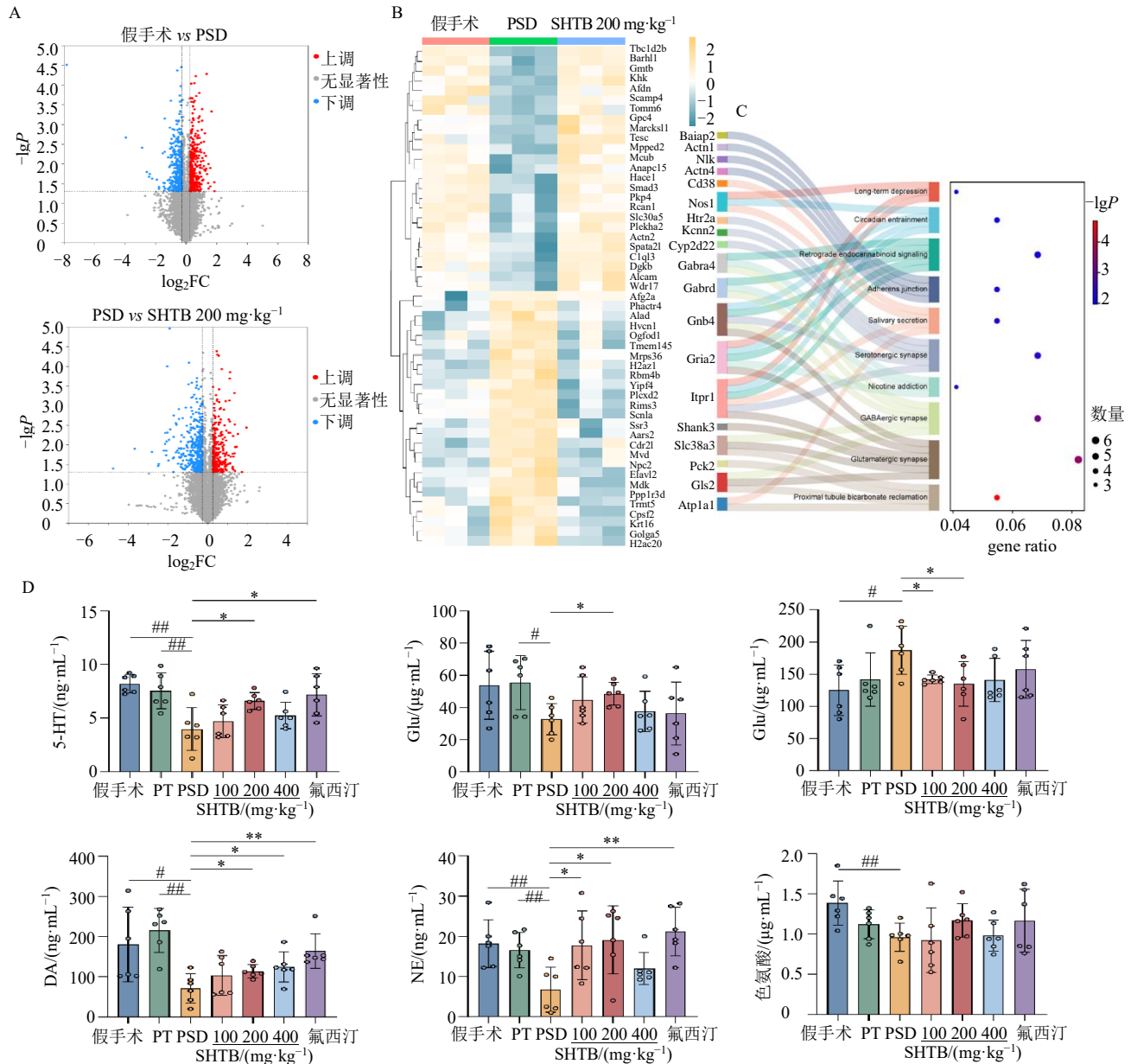
剂量组 DA 水平显著升高 ($P < 0.05$)；氟西汀组 5-HT、DA 和 NE 水平显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)，色氨酸水平呈升高趋势。

以上结果表明 SHTB 的抗抑郁效应可能通过调节突触信号通路、恢复神经递质稳态来实现，为其改善 PSD 行为表现提供了分子层面的依据。

3.8 抗生素清除肠道菌群会削弱 SHTB 的行为改善与神经保护作用

假手术+抗生素组、PSD+抗生素组和 SHTB+抗生素组小鼠在造模给药前均连续 7 d ig 广谱抗生素以耗竭肠道菌群随后自由饮用维持无菌状态(图 10-A)。粪便 DNA 浓度显著降低，证实肠道微生物群已被成功清除 ($P < 0.01$ ，图 10-B)。

行为学测试结果(图 10-C)显示，PSD 小鼠表现出明显的抑郁样和焦虑样行为：在 OFT 中自发活动显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01)，TST 不动时间延长



A-火山图显示各组前额叶皮层差异表达蛋白; B-基于差异蛋白表达的层次聚类热图; C-差异表达蛋白的 KEGG 通路富集分析; D-使用 LC-MS 对前额叶皮层神经递质进行定量 (n = 8)。

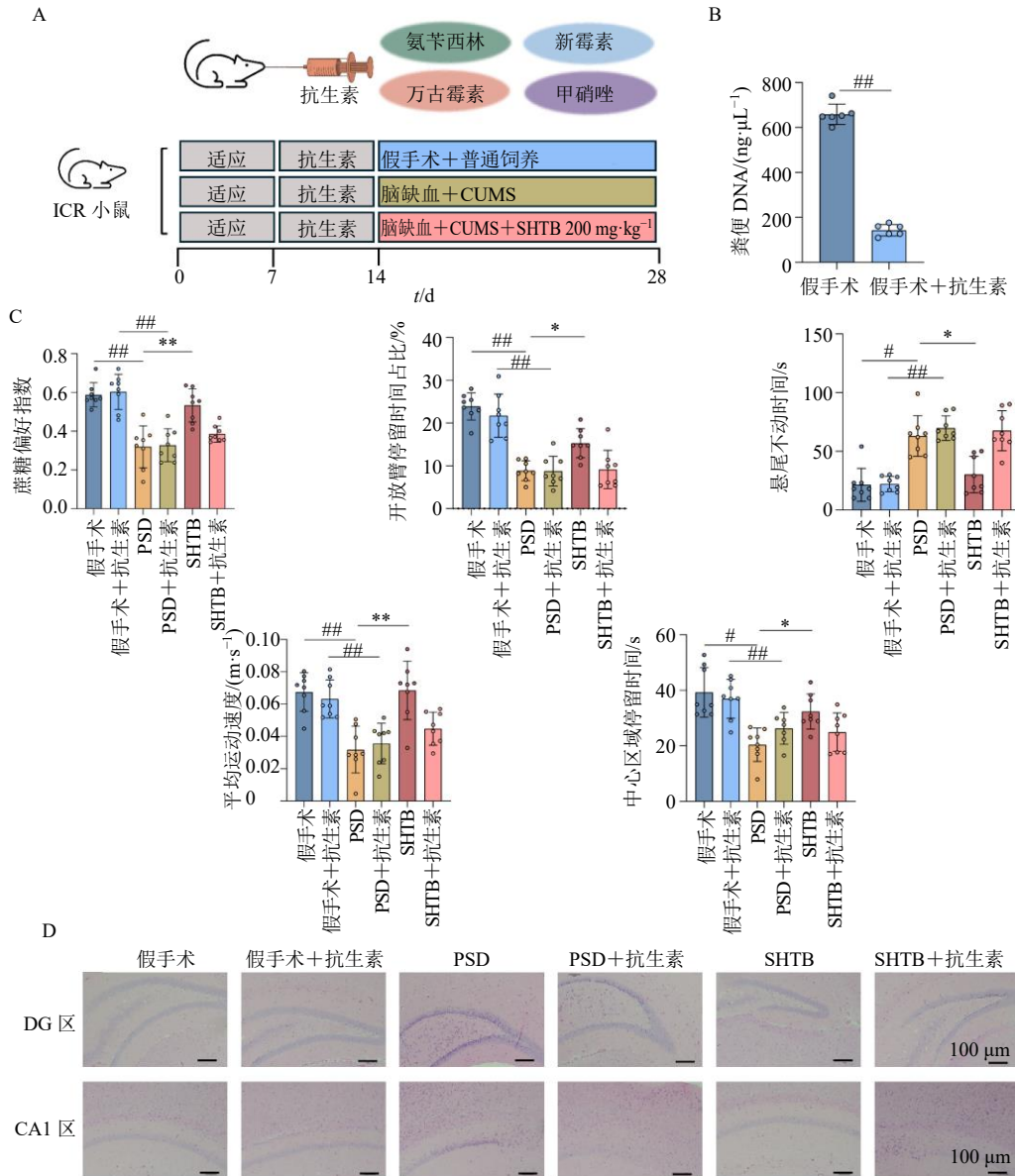
A-volcano plot showing differentially expressed proteins in prefrontal cortex among groups; B-hierarchical clustering heatmap based on differential protein expression; C-KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins; D-quantification of prefrontal cortex neurotransmitters using LC-MS (n = 8)。

图 9 蛋白组学分析及神经递质定量

Fig. 9 Proteomics analysis and neurotransmitter quantification

($P < 0.05$), EPM 进入开放臂的次数和停留时间均减少 ($P < 0.01$), SPT 中蔗糖偏好指数下降 ($P < 0.001$); SHTB 干预有效改善了上述行为异常 ($P < 0.05, 0.01$), 表现为运动活性提升、抑郁与焦虑样行为减少、蔗糖偏好增强。然而, 在肠道菌群耗竭后, SHTB 的行为改善作用显著减弱, SHTB+抗生素组的行为指标恢复程度明显低于菌群完整的 SHTB 组。

HE 染色结果 (图 10-D) 显示, 与假手术组相比, PSD 组神经元稀疏、紊乱并伴有显著形态损伤; 而 SHTB 干预能够明显改善神经元结构与排列的异常, 然而, 在肠道菌群耗竭后, SHTB 的神经保护作用显著减弱, SHTB+抗生素组的组织恢复程度明显低于菌群完整的 SHTB 组。上述结果提示, SHTB 在 PSD 小鼠中发挥的抗抑郁和神经保护作用至少部分依赖于肠道菌群的存在。



A-实验设计示意图; B-粪便DNA浓度 (n=8); C-各行为学测试结果 (n=8); D-海马组织HE染色结果 (×100)。

A-schematic of experimental design; B-fecal DNA concentrations (n=8); C-behavioral test results across groups (n=8); D-HE staining of hippocampal tissues (×100).

图 10 抗生素介导的肠道菌群耗竭削弱 SHTB 的行为改善及神经保护作用

Fig. 10 Antibiotic-mediated gut microbiota depletion attenuates behavioral and neuroprotective effects of SHTB

4 讨论

PSD 是一种病因复杂的神经精神障碍,其发病机制涉及多种病理过程,包括神经炎症、神经递质失衡以及“肠-脑轴”调控紊乱等^[31]。SHTB 作为临床常用于治疗功能性便秘的中成药,已有研究表明其能够调节肠道菌群组成并调控免疫反应^[32],还能通过重塑脂肪酸代谢来改善大鼠缺血性卒中^[17],提示其可能对 PSD 等神经精神类疾病具有潜在治疗作用。本研究采用光化学诱导的脑缺血模型联合 CUMS 成功构建了 PSD 小鼠模型,系统评估了

SHTB 对 PSD 的治疗效果并探究其潜在机制。发现肠道菌群依赖性的 SHTB 能够通过重塑肠道菌群、修复肠道屏障、调控脂肪酸代谢、抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 通路介导的外周及中枢炎症反应,并恢复关键神经递质平衡,多维度改善“肠-脑轴”功能,从而发挥抗 PSD 及神经保护作用。

“肠-脑轴”被认为是连接肠道微生态与中枢神经功能的重要双向调控网络。“肠-脑轴”功能稳态依赖肠道菌群结构平衡,菌群紊乱引发脂肪酸代谢失衡,使抗炎性短链脂肪酸(如丁酸盐)合成减少、

促炎相关代谢物累积,进而激活肠道局部免疫反应,促使 IL-6、TNF- α 等促炎因子释放,这一代谢失衡与炎症的关联已被多项研究证实^[33-34]。持续的肠道炎症会破坏肠黏膜屏障完整性,造成“肠漏”现象,使得肠道内的细菌毒素、炎症因子突破屏障进入外周血液循环,继而浸润中枢神经系统,干扰中枢免疫与代谢稳态,不仅影响色氨酸等神经递质前体物质的代谢通路,还会损伤神经突触功能,最终导致 5-HT、DA 等关键神经递质系统失衡,由此形成肠道菌群紊乱、脂肪酸代谢失衡、肠道炎症、肠屏障破坏、外周及中枢炎症浸润、神经递质失衡的“肠-脑轴”功能异常核心病理链条^[35]。

肠道菌群作为“肠-脑轴”的重要调节因子,在 PSD 的发生中起着起始性的作用。相关研究表明,黄连素能重塑肠道菌群、增加产丁酸菌与丁酸水平,抑制炎症,从而减轻脑缺血后的神经功能缺损^[36]。本研究的 16S rRNA 测序结果显示,PSD 小鼠出现明显的肠道菌群失衡,其特征包括 *Enterococcus* 等有益菌显著减少^[37],而 *Oscillibacter*、*Angelakisella*、*Harryflintia* 及 *Erysipelotrichaceae* 等促炎菌显著增殖^[38-40]。肠道菌群的紊乱不仅影响炎症状态,还可通过改变脂肪酸代谢来进一步调控代谢稳态。*Oscillibacter* 菌属已被报道与宿主脂质代谢密切相关,其某些物种能够发酵生成短链脂肪酸(如戊酸)并可能与胆固醇稳态关联,提示其增殖可能改变宿主脂肪酸代谢途径及脂类物质处理能力^[41]。此外,*Erysipelotrichaceae* 这一细菌科的成员在肠道脂质和胆固醇代谢中表现出相关性,其丰度变化与宿主肝脏脂质水平和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)等指标呈显著关联,暗示该类菌群失衡可能影响脂肪酸及胆固醇代谢网络^[42]。虽然针对 *Angelakisella* 和 *Harryflintia* 的代谢功能尚缺乏直接机制性报道,但已有多项高脂饮食和代谢组研究显示,这类厚壁菌门相关类群增加通常伴随着短链脂肪酸产物改变、能量代谢紊乱及脂质代谢表型改变,这可能通过影响肠道产物(如短链脂肪酸或其他脂质代谢中间体)进入宿主循环来调节脂肪酸氧化和合成平衡^[43]。因此,本研究中观察到的 PSD 小鼠体内这些促炎菌显著增殖可能不仅与炎症通路激活相关,同时也通过扰动脂肪酸及胆固醇相关代谢通路,参与卒中后系统性代谢及炎症表型的形成。

越来越多研究表明,肠道微生物通过其代谢活

性及产生的代谢物(如短链脂肪酸、微生物改造的多不饱和脂肪酸等),不仅可以促进宿主脂肪酸的不饱和化、延长及代谢途径改变,还能调控花生四烯酸等多不饱和脂肪酸的代谢水平,从而显著影响宿主脂质代谢状态^[44]。本研究发现 SHTB 可显著调节粪便及脑组织中的多条脂肪酸相关代谢通路,包括不饱和脂肪酸生物合成、脂肪酸降解、花生四烯酸代谢、脂肪酸延长及脂肪酸生物合成等,这些代谢通路与炎症调控及神经功能密切相关。例如,花生四烯酸代谢紊乱可导致前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)、白三烯 B₄(leukotriene B₄, LTB₄)等促炎介质过量生成,激活 NF- κ B 信号通路并放大神经炎症反应^[45];相反,二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)、二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)等不饱和脂肪酸可通过过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)与 G 蛋白偶联受体 120(G protein-coupled receptor 120, GPR120)通路发挥抗炎作用,从而间接抑制 NF- κ B 的转录活性^[46]。SHTB 对上述脂质代谢通路的全面改善提示其作用机制不仅局限于局部肠道调控,更涉及系统性代谢重塑。

为了探讨外周脂质代谢调控是否影响中枢代谢,进一步进行了脑组织代谢组学分析。结果显示 PSD 小鼠脑内的多条脂肪酸相关代谢通路同样富集且紊乱,而 SHTB 能将这些代谢异常恢复至接近正常水平。进一步的 Spearman 相关分析发现,SHTB 上调的有益菌与脑组织中关键不饱和脂肪酸合成及降解代谢物呈正相关,揭示了肠道菌群与脑脂质代谢之间的密切联系,提示 SHTB 可能通过肠道菌群重塑支持脑内脂质稳态,从而减轻神经炎症并改善抑郁样行为。

在 PSD 的发病机制中,炎症反应扮演重要角色,卒中引发的免疫炎症反应可通过激活 TLR4 及其下游适配蛋白 MyD88,进而触发 NF- κ B 信号通路的激活,导致促炎细胞因子表达升高并促进小胶质细胞和星形胶质细胞的活化,参与 PSD 的发生和发展^[47]。此外,卒中诱导的肠道菌群失衡与肠屏障损伤可导致内毒素 LPS 易位至循环系统,进而通过 TLR4 触发系统性炎症和中枢神经炎症反应,这一“肠-脑轴”机制在卒中与神经精神并发症中的重要性已被多项研究证实^[48]。有研究证明,柴胡中的生物活性皂苷可通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路改善小鼠

抑郁样和焦虑样行为^[49]。本研究通过网络药理学分析发现 NF- κ B 信号通路可能是 SHTB 治疗 PSD 的潜在机制之一, Western blotting 结果表明 SHTB 显著降低了脑组织中 TLR4、MyD88 及磷酸化 NF- κ B 蛋白的表达水平,同时,还发现 SHTB 显著降低了 PSD 小鼠脑组织与血清中促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 LPS 水平,并显著抑制了海马区胶质细胞的激活,这些结果共同表明, SHTB 能够通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路,减轻 PSD 引发的外周及中枢神经炎症反应。此外,研究还发现 PSD 导致小鼠肠道紧密连接蛋白表达显著下降,而 SHTB 干预可显著恢复其表达。表明 SHTB 在抑制炎症反应的同时,还具有修复肠道屏障功能的作用,从而减少肠道内细菌毒素及炎症因子经受损屏障进入外周血液循环及中枢神经系统的风险,表明 SHTB 可能通过干预“肠-脑轴”异常,从而缓解 PSD。

炎症诱导的神经递质紊乱是 PSD 的核心病理特征之一。卒中引起的神经炎症可破坏神经递质的合成、释放、摄取和代谢,导致神经环路协调性受损,促进抑郁样行为的发生^[50-51]。相关研究发现,艾司氯胺酮能够通过调节氨基酸类神经递质的平衡有效改善难治性抑郁症^[52]。与此一致,本研究的蛋白质组富集分析发现 PSD 状态引起多条突触相关通路显著改变,特别是与 5-HT、GABA、Glu 等神经递质代谢相关的通路。LC-MS 定量结果进一步证实, PSD 小鼠体内多种关键神经递质的水平出现了显著的异常改变,表现为 5-HT、DA、NE、GABA 和色氨酸水平的下降,而兴奋性递质 Glu 水平升高,提示中枢单胺类与兴奋/抑制性神经递质系统严重失衡,与此前抑郁模型的结果一致^[53]。SHTB 处理后上述神经递质水平均明显恢复,其中 5-HT 和 GABA 的改善尤为显著。由于 5-HT 系统是经典的抗抑郁靶点,其恢复很可能是 SHTB 发挥抗抑郁作用的关键机制之一^[54]; GABA 能减轻卒中后的神经元过度兴奋性,有助于改善焦虑样表现,恢复中枢神经系统稳态^[55]。神经递质平衡的恢复不仅反映了行为学改善,也是前期炎症抑制与代谢稳态重塑共同作用的结果。整合炎症、代谢及神经递质的多组学数据,推测 SHTB 可能通过“炎症抑制-神经递质稳定”的机制阻断 PSD 的关键病理级联反应,即通过双重调控中枢炎症反应和神经递质稳态发挥抗抑郁作用。由于神经炎症与神经递质紊乱在 PSD 中形成恶性循环, SHTB 对两者的同时干预可能打破

这一病理环路,进而支撑行为学改善。

进一步的肠道菌群消耗实验为 SHTB 的作用机制提供了重要支持证据。在肠道菌群被显著削弱的情况下, SHTB 对 PSD 相关行为学的改善作用显著减弱、对 PSD 引起的神经损伤的保护作用显著降低。这说明 SHTB 的保护作用在很大程度上依赖完整的肠道微生态环境。这一发现不仅深化了对 PSD 发病机制的认识,也为中药在多系统疾病中的作用方式提供了新视角。

本研究通过多组学联合分析,系统揭示了 SHTB 改善 PSD 的内在链条。与以往单一指标或单一组学研究不同,本研究从肠道菌群结构、脂质代谢特征、脑内炎症信号通路及神经递质稳态多个层面,构建了一个相互关联、层层递进的作用网络。肠道菌群结构的恢复为代谢稳态提供基础,脂质代谢信号的重塑进一步影响炎症通路的激活状态,而中枢神经炎症的缓解最终体现在神经递质平衡与行为学改善上。这种由外周到中枢、由结构到功能的连续调控模式,体现了多组学联合分析在复杂疾病机制研究中的独特优势。

综上, SHTB 能够通过依赖肠道菌群的方式,显著改善 PSD 小鼠的抑郁样行为及神经元损伤,且治疗作用具有肠道菌群依赖性。其机制涉及重塑肠道菌群平衡、纠正脂肪酸代谢紊乱、降低神经炎症相关代谢物水平、恢复脑内神经递质稳态以及抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 炎症通路过度激活。本研究发现 SHTB 具有抗 PSD 的功效,并首次从“菌群-肠-脑轴”角度,系统阐释了 SHTB 治疗 PSD 的多靶点机制,拓展了 SHTB 在神经精神疾病领域的应用与理论认知,为其临床应用提供了理论依据。然而,本研究仍存在一定局限性:其一,本研究基于动物模型开展,尽管较好模拟了 PSD 的核心病理特征,但研究结论向临床人群的外推仍需进一步验证;其二,虽然多组学分析揭示了肠道菌群、脂肪酸代谢与神经炎症之间的协同变化,但尚未对关键菌属或特定代谢物进行定向干预验证,其精细化分子机制仍有待深入探讨;此外, SHTB 作为多成分复方,其关键活性成分及其在不同调控层级中的具体作用仍需在后续研究中进一步解析。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Richter D, Charles James J, Ebert A, *et al.* Selective serotonin reuptake inhibitors for the prevention of post-

- stroke depression: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(24): 5912.
- [2] Tinsae T, Getinet W, Fentahun S, et al. Exploring the occurrence and risk factors of post-stroke depression among stroke survivors in Africa: A comprehensive systematic review and Meta-analysis [J]. *BMC Public Health*, 2025, 25(1): 1547.
- [3] Legg L A, Tilney R, Hsieh C F, et al. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for stroke recovery [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, 2019(11): CD009286.
- [4] Shaik L, Kashyap R, Thotamgari S R, et al. Gut-brain axis and its neuro-psychiatric effects: A narrative review [J]. *Cureus*, 2020, 12(10): e11131.
- [5] Kim Y K, Shin C. The microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric disorders: Pathophysiological mechanisms and novel treatments [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16(5): 559-573.
- [6] Xu Q, Sun L H, Chen Q, et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to depression-like behaviors via hippocampal NLRP3-mediated neuroinflammation in a postpartum depression mouse model [J]. *Brain Behav Immun*, 2024, 119: 220-235.
- [7] Dinan T G, Cryan J F. The microbiome-gut-brain axis in health and disease [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2017, 46(1): 77-89.
- [8] Foster J A, McVey Neufeld K A. Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression [J]. *Trends Neurosci*, 2013, 36(5): 305-312.
- [9] Diaz Heijtz R, Wang S G, Anuar F, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(7): 3047-3052.
- [10] Harrison N A, Critchley H D. The neuroendocrinology of immune-to-brain signaling [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2013, 27(6): 785-798.
- [11] Bruno A, Dolcetti E, Rizzo F R, et al. Inflammation-associated synaptic alterations as shared threads in depression and multiple sclerosis [J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 169.
- [12] Matos L C, Machado J P, Monteiro F J, et al. Understanding traditional Chinese medicine therapeutics: An overview of the basics and clinical applications [J]. *Healthcare*, 2021, 9(3): 257.
- [13] 张天一, 王慧, 何孝忠, 等. 首荟通便胶囊通过调控 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路抑制幽门螺杆菌诱导的炎症反应 [J]. *中草药*, 2025, 56(24): 9055-9062.
- [14] Bai J Z, Cai Y J, Huang Z Y, et al. Shouhui Tongbian Capsule ameliorates constipation via gut microbiota-5-HT-intestinal motility axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154: 113627.
- [15] 梁红宝, 孙建之, 姜宇珺, 等. 基于 GC-MS 和 UPLC-Q-Exactive MS 技术的首荟通便胶囊质量标志物研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(21): 6674-6685.
- [16] Yang J Y, Xiao H, Yao J C, et al. Integrated serum pharmacochimistry, 16S rDNA sequencing, and metabolomics to reveal the material basis and mechanism of Shouhui Tongbian Capsule against diphenoxylate-induced slow transit constipation in rats [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 142.
- [17] Wei F J, Zhou J D, Pan L H, et al. Integrative microbiomics, proteomics and lipidomics studies unraveled the preventive mechanism of Shouhui Tongbian Capsules on cerebral ischemic stroke injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337(Pt 2): 118874.
- [18] Freireich E J, Gehan E A, Rall D P, et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, Hamster, dog, monkey, and man [J]. *Cancer Chemother Rep*, 1966, 50(4): 219-244.
- [19] Labat-gest V, Tomasi S. Photothrombotic ischemia: A minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies [J]. *J Vis Exp*, 2013(76): e50370.
- [20] Antoniuk S, Bijata M, Ponimaskin E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 99: 101-116.
- [21] Cryan J F, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, 29(4/5): 571-625.
- [22] Lister R G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse [J]. *Psychopharmacology*, 1987, 92(2): 180-185.
- [23] Wulff A B, Cooper P, Kodjo E, et al. How sucrose preference is gained and lost: An in-depth analysis of drinking behavior during the sucrose preference test in mice [J]. *eNeuro*, 2023, 10(9): ENEURO.0195-ENEURO.0123.2023.
- [24] Kraeuter A K, Guest P C, Sarnyai Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 99-103.
- [25] Dunn C, Brettle D, Cockroft M, et al. Quantitative assessment of H&E staining for pathology: Development and clinical evaluation of a novel system [J]. *Diagn Pathol*, 2024, 19(1): 42.
- [26] Csabai D, Seress L, Varga Z, et al. Electron microscopic analysis of hippocampal axo-somatic synapses in a chronic stress model for depression [J]. *Hippocampus*, 2017, 27(1): 17-27.
- [27] Xu H R, Wang Z R, Zhu L, et al. Targeted neurotransmitters profiling identifies metabolic signatures in rat brain by LC-MS/MS: Application in insomnia, depression and Alzheimer's disease [J]. *Molecules*, 2018,

- 23(9): 2375.
- [28] Cui D Y, Li M, Liu M F, *et al.* Synergistic effect and mechanism of monoacylglycerol lipase inhibitor and icaritin in the treatment of ulcerative colitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 142(Pt A): 113155.
- [29] Sun C H, Cao N N, Wang Q G, *et al.* Icaritin induces resolution of inflammation by targeting cathepsin B to prevents mice from ischemia-reperfusion injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116: 109850.
- [30] Kang M, Mischel R A, Bhawe S, *et al.* The effect of gut microbiome on tolerance to morphine mediated antinociception in mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42658.
- [31] Robinson R G, Jorge R E. Post-stroke depression: A review [J]. *Am J Psychiatry*, 2016, 173(3): 221-231.
- [32] Gong L P, Du H, Guo X, *et al.* Shouhui Tongbian Capsule in treatment of constipation: Treatment and mechanism development [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 16(2): 239-247.
- [33] Cao Q Y, Shen M M, Li R Q, *et al.* Elucidating the specific mechanisms of the gut-brain axis: The short-chain fatty acids-microglia pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2025, 22(1): 133.
- [34] Kearns R. Gut-brain axis and neuroinflammation: The role of gut permeability and the kynurenine pathway in neurological disorders [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2024, 44(1): 64.
- [35] Jabbari Shiadeh S M, Chan W K, Rasmusson S, *et al.* Bidirectional crosstalk between the gut microbiota and cellular compartments of brain: Implications for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders [J]. *Transl Psychiatry*, 2025, 15(1): 278.
- [36] Duan H J, Hu J Y, Deng Y, *et al.* Berberine mediates the production of butyrate to ameliorate cerebral ischemia via the gut microbiota in mice [J]. *Nutrients*, 2023, 16(1): 9.
- [37] Jiang W X, Gong L, Liu F, *et al.* Alteration of gut microbiome and correlated lipid metabolism in post-stroke depression [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 663967.
- [38] Krishna K V, Koujalagi K, Surya R U, *et al.* *Enterococcus* species and their probiotic potential: Current status and future prospects [J]. *J App Biol Biotech*, 2023, 11(1): 36-44.
- [39] Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, Kuffa P, *et al.* Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases [J]. *Intest Res*, 2016, 14(2): 127-138.
- [40] Alsulaiman R M, Al-Quorain A A, Al-Muhanna F A, *et al.* Gut microbiota analyses of inflammatory bowel diseases from a representative Saudi population [J]. *BMC Gastroenterol*, 2023, 23(1): 258.
- [41] Kovatcheva-Datchary P. Gut microbes shaping lipid metabolism: Oscillibacter-driven cholesterol modulation and short-chain fatty acid production [J]. *Cell*, 2024, 187(22): 3895-3912.
- [42] Martínez I, Perdicaro D J, Brown A W, *et al.* Diet-induced alterations of host cholesterol metabolism are likely to affect the gut microbiota composition in hamsters [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(2): 516-524.
- [43] Ley R E, Bäckhed F, Turnbaugh P, *et al.* Obesity alters gut microbial ecology [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 11070-11075.
- [44] Qiu H, Wen Y H, Luo Y D, *et al.* Gut microbiota regulates serum metabolites in mice with nonalcoholic fatty liver disease via gut metabolites: Mechanisms involving branched-chain amino acids and unsaturated fatty acids [J]. *Front Endocrinol*, 2025, 16: 1606669.
- [45] Lin H, Ou M, Chen J, *et al.* Research progress on gut microbiota and human diseases [J]. *Int J Biomed Eng*, 2019, 42(3): 258-262.
- [46] 赖金胜, 陈琛. 花生四烯酸的细胞色素 P450 酶代谢途径产物 EETs 和 20-HETE 在血管功能调控中的作用 [J]. *生理学报*, 2021, 73(4): 631-645.
- [47] Feng X Y, Ma X J, Li J, *et al.* Inflammatory pathogenesis of post-stroke depression [J]. *Aging Dis*, 2024, 16(1): 209-238.
- [48] Xie W Y, Yan X, Yang X, *et al.* The regulation of neuroinflammatory response after stroke by intestinal flora microorganisms [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2025, 15: 1594834.
- [49] Zhang L, Liu Y, Chen W. Saikosaponins from *Bupleurum chinense* ameliorate depressive-like and anxious-like behaviors in mice via inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 332: 122289.
- [50] Garcia C, Andersen C J, Blesso C N. The role of lipids in the regulation of immune responses [J]. *Nutrients*, 2023, 15(18): 3899.
- [51] Guo Q, Jin Y Z, Chen X Y, *et al.* NF- κ B in biology and targeted therapy: New insights and translational implications [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 53.
- [52] Yang Y, Zhang L, Li M, *et al.* Esketamine ameliorates treatment-resistant depression by regulating glutamate-GABA balance in the prefrontal cortex [J]. *Neuropsychopharmacol*, 2025, 50(8): 1324-1335.
- [53] Davla S, Daly E, Nedow J, *et al.* An LC-MS/MS method for simultaneous analysis of up to six monoamines from brain tissues [J]. *J Chromatogr B*, 2023, 1216: 123604.
- [54] Ślifierki G, Król M, Turło J. 5-HT receptors and the development of new antidepressants [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 9015.
- [55] Carmichael S T. Brain excitability in stroke: The *Yin* and *Yang* of stroke progression [J]. *Arch Neurol*, 2012, 69(2): 161-167.