

左归降糖解郁方调控小胶质细胞 TREM2/C1q 信号改善糖尿病并发抑郁症海马神经元突触丢失的机制研究

李 中¹, 简晓源¹, 姜 帆¹, 姚淑霞¹, 王宇红^{2,3}, 谭 琥^{1*}, 刘 检^{1*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

2. 抑郁类疾病中医药防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

3. 湖南中医药大学中医药科学院, 湖南 长沙 410208

摘要:目的 探讨左归降糖解郁方调控髓系细胞触发受体 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2)/补体 1q (complement component 1q, C1q) 信号介导的小胶质细胞突触修剪改善糖尿病并发抑郁症 (diabetes-related depression, DD) 海马神经元突触丢失的保护作用及机制。方法 复制 DD 大鼠模型, 设置对照组、模型组、TREM2 抑制剂 (IN1, 1.5 μg/kg) 组、TREM 激动剂 (AL002, 2 μg/kg) 组、阳性药 (二甲双胍 0.18 g/kg+氟西汀 1.8 mg/kg) 组和左归降糖解郁方 (10.26 g/kg) 组。分别培养 SD 大鼠原代小胶质细胞和海马神经元, 采用 150 mmol/L 高糖联合 200 μmol/L 皮质酮干预构建模拟 DD 环境下的体外共培养细胞模型, 设置对照组、模型组、TREM2 抑制剂 (IN1, 2 μmol/L) 组、TREM2 激动剂 (AL002, 5 μmol/L) 组、阳性药 (10%阳性药含药血清) 组和左归降糖解郁方 (10%左归降糖解郁方含药血清) 组。采用旷场、强迫游泳和糖水偏好实验评估大鼠抑郁样行为; 高尔基染色观察大鼠海马神经元突触丢失情况; 细胞成像分析观察体外小胶质细胞和海马神经元形态学情况; 尼氏染色观察体外海马神经元突触损伤情况; 免疫荧光检测大鼠海马小胶质细胞或体外小胶质细胞中 TREM2、C1q 以及大鼠海马神经元或体外海马神经元中突触后密度蛋白 95 (postsynaptic density protein 95, PSD95) 蛋白表达; Western blotting 检测海马组织或体外小胶质细胞中 TREM2 蛋白表达。结果 动物实验结果表明, 左归降糖解郁方显著增加大鼠旷场实验总活动路程与糖水偏好率 ($P<0.01$), 减少强迫游泳不动时间 ($P<0.01$), 上调海马小胶质细胞中 TREM2 表达 ($P<0.01$), 并抑制 C1q/PSD95 信号介导的小胶质细胞突触过度修剪继而改善大鼠海马神经元突触丢失 ($P<0.05, 0.01$)。细胞实验结果表明, 左归降糖解郁方含药血清可显著上调 TREM2 表达并抑制 C1q/PSD95 信号介导的小胶质细胞突触过度修剪继而逆转海马神经元突触丢失 ($P<0.05, 0.01$)。结论 左归降糖解郁方能有效改善 DD 海马神经元突触丢失, 进而缓解大鼠抑郁样行为, 其机制可能与调控 TREM2/C1q 信号介导的小胶质细胞突触过度修剪有关。

关键词: 糖尿病并发抑郁症; TREM2/C1q 信号; 突触修剪; 突触丢失; 左归降糖解郁方; 马钱苷; 芍药苷; 丹酚酸 B; 毛蕊异黄酮苷; 梓醇

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)07-2602-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.07.015

Mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula in improving synaptic loss of hippocampal neurons via regulating microglial TREM2/C1q signaling in diabetes-related depression rats

LI Zhong¹, LIN Xiaoyuan¹, JIANG Fan¹, YAO Shuxia¹, WANG Yuhong^{2,3}, TAN Hu¹, LIU Jian¹

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

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

3. Academy of Chinese Medical Sciences of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

收稿日期: 2025-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104793); 湖南省自然科学基金资助项目 (2025JJ80936, 2025JJ80965, 2024JJ6358); 湖南省教育厅科研项目 (24B0374, 24A0284); 湖南省卫健委科研项目 (W20243182, 20255684)

作者简介: 李 中, 主治医师, 医学博士, 从事中医药防治脑病及精神情志类研究。E-mail: 983695421@qq.com

*通信作者: 谭 琥, 博士, 副教授, 从事中医药防治脑病研究。E-mail: dzbtanhu@hnuocm.edu.cn

刘 检, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事脑病创新药物研究。E-mail: 474299877@qq.com

Abstract: Objective To reveal the mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula (左归降糖解郁方, ZGF) to improve synaptic loss of hippocampal neuron based on triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2)/complement component 1q (C1q) signaling-mediated microglial cell synaptic pruning in diabetes-related depression (DD) rats. **Methods** The model of DD rats was established and rats were randomly divided into control group, model group, TREM2 inhibitor (IN1, 1.5 μg/kg) group, TREM2 agonist (AL002, 2 μg/kg) group, positive drug (metformin 0.18 g/kg + fluoxetine 1.8 mg/kg) group and ZGF (10.26 g/kg) group. Primary microglia and hippocampal neurons from SD rats were cultured separately. An *in vitro* co-culture cell model simulating the DD environment was constructed by treating with 150 mmol/L high glucose combined with 200 μmol/L corticosterone, control group, model group, TREM2 inhibitor (IN1, 2 μmol/L) group, TREM2 agonist (AL002, 5 μmol/L) group, positive drug (10% positive drug-containing serum) group and ZGF (10% ZGF-containing serum) group were set up. Depression-like behavior was evaluated by open field, forced swimming and sucrose preference test. Synaptic loss of hippocampal neuron was observed by Golgi staining. Morphology and structure of microglia and hippocampal neuron was observed by cell imaging analysis. Nissl's staining was used to observe synaptic loss of hippocampal neuron. The protein expressions of TREM2 and C1q in rat hippocampal microglia or *in vitro* microglia, and postsynaptic density protein 95 (PSD95) in rat hippocampal neurons or *in vitro* hippocampal neurons were detected by immunofluorescence. The expressions of TREM2 protein in hippocampal tissue or *in vitro* microglia were detected by Western blotting. **Results** The animal experiment results showed that ZGF significantly increased the total activity distance and sugar water preference rate of rats in open field experiment ($P < 0.01$), reduced forced swimming immobility time ($P < 0.01$), up-regulated TREM2 expression in hippocampal microglia ($P < 0.01$), and inhibited C1q/PSD95 signal mediated excessive pruning of microglial synapses, thereby improving synaptic loss in rat hippocampal neurons ($P < 0.05, 0.01$). The results of cell experiments showed that the serum containing ZGF could significantly up-regulate TREM2 expression and inhibit C1q/PSD95 signal mediated synaptic pruning in microglia, thereby reversing synaptic loss in hippocampal neurons ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** ZGF effectively mitigate the synaptic loss of hippocampal neuron and thereby alleviate depressive behavior in rats, the mechanism of which might be related to the regulation of excessive synaptic pruning of microglia mediated by TREM2/C1q signaling.

Key words: diabetes-related depression; TREM2/C1q signaling; synaptic pruning; synaptic loss; Zuogui Jiangtang Jieyu Formula; loganin; paeoniflorin; salvanolic acid B; calycosin-7-O-β-D-glucoside; catalpol

2025 年全球糖尿病患者已达 6.29 亿，中国是糖尿病第一大国，患者人数逾 1.4 亿。糖尿病并发症多，其威胁远超出了人们预期，每年其并发症引起死亡人数高达 500 万，其中糖尿病并发抑郁症（diabetes-related depression, DD）是致死致残的重要元凶之一^[1]。DD 发病隐匿，易反复且致死率高，临床上两者相互干扰而双向恶性循环，深层病理机制不明，药物治疗预后不佳^[2-3]，故开展 DD 发病机制及药物防治研究已迫在眉睫。

目前西医临床治疗 DD 缺乏特异性药物，主要依赖血糖控制与抗抑郁药物的联合治疗，但存在复发率高、药物不良反应显著、医疗成本高昂等局限^[3-4]。DD 在中医理论中属于“消渴病”与“郁证”的复合证型^[5]，其核心病机为“气阴两虚为本，气血瘀阻为标，情志失调为诱因”。中医药通过辨证论治体系，可实现对机体的整体调节，在降低血糖水平、改善抑郁情绪及躯体症状方面具有显著优势。课题组基于 DD “虚-瘀-郁”的病机特点，在左归丸的基础上组方左归降糖解郁方，滋阴益气、化瘀解郁，疗效显著^[6-8]。故立足 DD 中医病机特点，探索

左归降糖解郁方的作用特色，具有重要的临床意义和科学价值。

突触是中枢神经系统中信息传递的桥梁，突触丢失是抑郁症的一个重要病理特征，其与认知功能损害的严重程度呈正相关^[9]。最新研究发现，在糖尿病状态下，中枢胰岛素抵抗介导小胶质细胞突触修剪造成神经元突触连接损害、突触丢失增加^[10]。此外，课题组前期研究表明，免疫受体分子样家族成员 f（immune receptor molecule-like family member, CD300f）驱动小胶质细胞-海马神经元异常串话介导海马神经元突触微环境损伤而诱发 DD^[11-14]。CD300f 是一种髓系细胞触发受体 2（triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2）样免疫受体，研究发现 TREM2 及其下游信号密切参与了糖尿病及抑郁状态下的小胶质细胞糖代谢、神经免疫和突触修剪过程，突触丢失作为突触微环境损伤的重要表现形式^[15-16]，但在 DD 发生时，TREM2 如何介导小胶质细胞突触修剪继而导致海马神经元突触丢失目前仍不清楚。故本研究拟从体内动物和体外细胞 2 个层次，以 TREM2

介导的小胶质细胞突触修剪为切入点,进一步明确左归降糖解郁方改善海马神经元突触丢失的药理机制,为DD有效防治提供新思路和新靶标。

1 材料

1.1 动物

8周龄SPF级雄性SD大鼠80只(其中70只进行动物实验,10只制备含药血清),孕15~17d SPF级SD雌雄大鼠2只,新生2~3d SPF级大鼠20只,均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号SCXK(湘)2021-0002。动物实验经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(批准号ZYFY-202409182)。

1.2 药材

左归降糖解郁方由熟地黄15g、山茱萸12g、枸杞12g、菟丝子9g、贯叶金丝桃3g、丹参12g、牡丹皮6g、姜黄9g、牛膝9g、杜仲9g、黄芪18g组成,上述药材饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院,并经湖南中医药大学第一附属医院药学部张志国教授分别鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.的块根经加工蒸晒而成、山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.的干燥成熟果肉、茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L.的干燥成熟果实、旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam.的干燥成熟种子、藤黄科植物贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L.的干燥地上部分、唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.的干燥根和根茎、毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.的干燥根皮、姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L.的干燥根茎、苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl.的干燥根、杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv.的干燥树皮、豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao的干燥根,均符合《中国药典》2025年版规定。

将上述各药材饮片按比例混合后,加入10倍量水,武火煮沸后文火1.5h,滤过;滤渣加入8倍量水,武火煮沸后文火1h,滤过,合并2次滤液,浓缩成生药量为3.078g/mL的水煎液。课题组前期采用LC-MS/MS鉴定出左归降糖解郁方中的30种化学成分,并对其中5种主要成分进行了定量分析,其中马钱苷3.48mg/g、芍药苷2.05mg/g、丹酚酸B1.08mg/g、毛蕊异黄酮苷1.66mg/g和梓醇2.46mg/g^[17]。

1.3 药品与试剂

盐酸二甲双胍片(国药准字H33020106,批号A241025)购自浙江亚太药业股份有限公司;盐酸氟西汀胶囊(国药准字J20080016,批号2456A)购自法国Patheon公司;链脲佐菌素(streptozocin, STZ,批号2025Q027)购自北京索莱宝生物科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEMF/12培养基、Neuronbasal神经元培养基、B27(批号分别为42G5093K12175294、8152405、2458319、2283823)购自美国Gibco公司;TREM2抑制剂IN1、TREM2激动剂AL002(批号分别为24021、24650)购自美国MCE公司;兔抗大鼠TREM2、突触后密度蛋白95(postsynaptic density protein 95, PSD95)抗体(批号分别为47D4308、15G0692)购自美国Affinity公司;小鼠抗大鼠离子钙结合适配分子1(ionized calcium-binding adapter molecule 1, IBA1)抗体、小鼠抗大鼠补体1q(complement component 1q, C1q)抗体、山羊抗兔Alexa Fluor® 488二抗、山羊抗小鼠Cy3二抗(批号分别为10023543、10062754、2300426、2400437)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.4 仪器

LabMaze型动物行为学分析系统(北京众实迪创科技发展有限公司);Galaxy170R型二氧化碳培养箱(德国Eppendorf公司);Vectra型智能组织切片成像系统(美国Perkinelmer公司);MPTC型蛋白印记系统(美国Bio-Rad公司);LSM800型超高分辨率激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组与给药

参照文献方法^[18-20],选取SPF级雄性SD大鼠70只,适应性饲养5d后,随机选取10只大鼠作为对照组,余下60只大鼠经4周高脂饲料喂养后,通过尾iv38mg/kgSTZ复制2型糖尿病模型。注射STZ后第3天检测大鼠尾尖血糖,筛选血糖大于16mmol/L的大鼠50只,按体质量和血糖水平随机分为模型组、TREM2抑制剂(IN1,1.5μg/kg)组、TREM2激动剂(AL002,2μg/kg)组、阳性药(二甲双胍0.18g/kg+氟西汀1.8mg/kg)组、左归降糖解郁方(10.26g/kg,为人临床等效剂量)组,每组10只。随后采用慢性温和不可预知应激(chronic mild and unpredictable stress, CUMS)联合孤养处理28d,随机刺激因素包括:禁水/禁

食 24 h、4 °C 冰水浴或 40 °C 温水浴 4 min、夹尾 1 min、电击 1 min、倾笼 45° 24 h 及昼夜颠倒 24 h。其中，倾笼、昼夜颠倒、电击和夹尾每周实施 2 次，其余刺激每周 1 次，即可成功复制稳定可靠的 DD 大鼠模型^[13-15]。除对照组外，其余组大鼠在 CUMS 造模第 2 周完成后进行给药处理，其中左归降糖解郁方组与阳性药组连续 ig 给药 14 d，TREM2 抑制剂组与 TREM2 激动剂组每周 1 次于海马区微量注射给药，对照组和模型组大鼠 ig 等体积的蒸馏水 (10 mL/kg)。

2.2 行为学检测

各组大鼠在末次给药后第 1 天开展旷场实验，先进行 60 s 环境适应，随后利用动物行为学分析系统记录 4 min 内大鼠总活动路程；于末次给药后第 2 天进行强迫游泳实验，先适应 30 s，随后记录 4 min 内大鼠游泳不动时间，以反映其抑郁样行为。末次给药前大鼠进行糖水适应性训练 3 d，第 1 天在左右两侧都放上 1%蔗糖溶液，第 2 天将其中 1 瓶蔗糖溶液换成蒸馏水，下午将左右两边的蔗糖溶液和蒸馏水互换位置，第 3 天禁食禁水，于第 4 天开始正式检测，左侧放 1%蔗糖溶液，右侧放蒸馏水，1 h 后互换位置，计算 2 h 内大鼠 1%蔗糖溶液和蒸馏水的摄入量，计算糖水偏好率。

糖水偏好率 = 糖水消耗量 / (蒸馏水消耗量 + 糖水消耗量)

2.3 高尔基染色

参照文献方法^[21]，取灌注后大鼠全脑组织，置于高尔基工作液中染色 14 d (前 48 h 浸泡后更换新染液，此后每 3 天换液 1 次)。经蒸馏水洗涤 3 次后，以 80%冰醋酸浸泡过夜，再转移至 30%蔗糖溶液避光过夜。待组织晾干后封片，通过智能组织切片成像系统观察大鼠海马脑区神经元树突、树突棘结构变化及突触丢失情况。

2.4 含药血清制备

取 SPF 级雄性 SD 大鼠 10 只，随机分为空白血清 (等体积蒸馏水) 组、左归降糖解郁方 (30.78 g/kg，为成人等效剂量的 3 倍) 组和阳性药 (二甲双胍 0.54 g/kg + 氟西汀 5.4 mg/kg，为成人等效剂量的 3 倍) 组，其中空白血清组 4 只，余下 2 组各 3 只。各给药组 ig 相应药物，每日 2 次，连续给药 3 d。末次给药 1 h 后，经腹主动脉采血，4 500 r/min 离心 10 min 分离血清。将血清置于 56 °C 水浴灭活 30 min，1 200 r/min 离心 5 min 取上清，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌后分装至 1.5 mL 离心管，-80 °C 保存备用。

2.5 细胞原代培养、造模、分组与给药

基于课题组前期建立的成熟模型^[22-24]，先培养 SD 大鼠原代小胶质细胞 (5% FBS + 95% DMEMF/12 培养基) 和海马神经元 (2% B27 + 98% Neuronbasal 神经元培养基)，并构建共培养体系，通过 150 mmol/L 高糖联合 200 μmol/L 皮质酮干预 18 h 构建模拟 DD 环境下的体外细胞模型，并随机分为对照组 (10%空白血清)、模型组 (10%空白血清)、TREM2 抑制剂 (IN1, 2 μmol/L) 组、TREM2 激动剂 (AL002, 5 μmol/L) 组、阳性药组 (10%阳性药含药血清) 和左归降糖解郁方组 (10%左归降糖解郁方含药血清)，干预 24 h 后收集细胞样本用于后续检测。

2.6 细胞形态学观察

完成造模及给药干预后，通过细胞成像分析系统观察原代小胶质细胞与海马神经元的形态结构变化情况。

2.7 尼氏染色

完成造模及给药干预后，将海马神经元分别经 4%多聚甲醛固定 45 min、0.25% Triton-100 通透 15 min 后，加入终体积分数 0.000 4% FJB 工作液，4 °C 避光孵育 60 min，弃去液体；加入 DAPI 工作液，室温避光孵育 20 min，于激光共聚焦显微镜下拍照，观察各组海马神经元树突、树突棘结构变化情况。

2.8 免疫荧光染色

动物实验取各组灌注后的全脑，经包埋、切片、封闭等处理后，分别孵育兔抗大鼠 TREM2 (1 : 100)、PSD95 (1 : 100) 与小鼠抗大鼠 IBA1 (1 : 400)、C1q (1 : 100) 一抗稀释液，4 °C 避光孵育过夜，加入山羊抗兔 Alexa Fluor® 488 和山羊抗小鼠 Cy3 二抗稀释液 (1 : 400)，37 °C 避光孵育 60 min，加入含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片液，于激光共聚焦显微镜下拍照，以相对荧光强度评估蛋白表达。

细胞实验完成造模及给药干预后，分别经 4%多聚甲醛固定 45 min、0.25% Triton-100 通透 15 min、5%牛血清白蛋白封闭 30 min 后，其中小胶质细胞加入兔抗大鼠 TREM2 (1 : 100) 和小鼠抗大鼠 IBA1 (1 : 200)、C1q (1 : 100) 一抗稀释液，海马神经元加入兔抗大鼠 PSD95 (1 : 100) 一抗稀释液，4 °C 避光孵育过夜；加入山羊抗兔 Alexa Fluor® 488 和山羊抗小鼠 Cy3 二抗稀释液 (1 : 400)，37 °C 避光孵育 30 min；加入 DAPI 工作液于室温避光孵育 20 min，于激光共聚焦显微镜下拍照，以相对荧光强度

值评估蛋白表达。

2.9 Western blotting 检测

动物实验取各组海马组织，加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液，提取总蛋白并定量，随后经变性、电泳、转膜和封闭等处理后，分别加入兔抗大鼠 TREM2 (1:500) 一抗稀释液，4 °C 孵育过夜，加入 HRP 标记的二抗，摇床中室温孵育 60 min，显色后采用超灵敏多色荧光成像系统曝光，计算灰度值评估各组蛋白相对表达水平。

细胞实验完成造模及给药干预后，收集小胶质细胞后，其余操作同上。

2.10 统计学分析

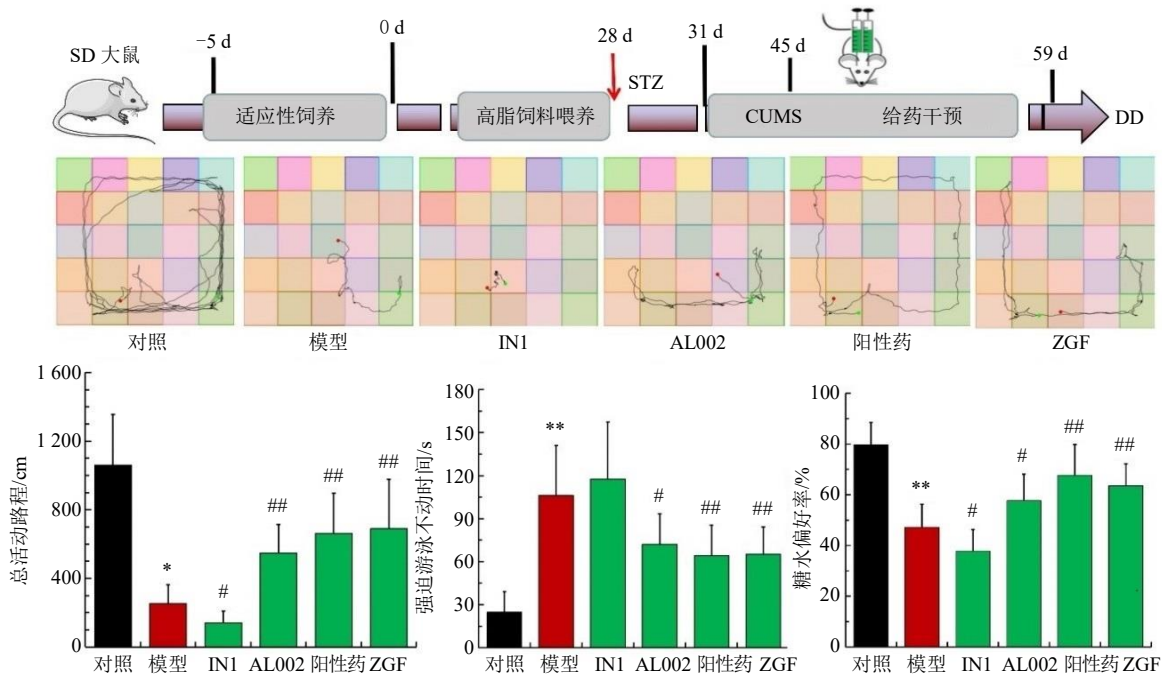
采用 SPSS 16.0 统计软件进行处理，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。先对数据进行方差齐性检验，不同组

间比较采用 One-Way ANOVA 分析，其中方差齐性采用 LSD 检验，方差非齐性采用 Dunnett's T3 检验。

3 结果

3.1 左归降糖解郁方对 DD 大鼠抑郁样行为的影响

如图 1 所示，与对照组比较，模型组大鼠旷场实验中总活动路程和糖水偏好率明显减少 ($P < 0.01$)，强迫游泳不动时间明显增加 ($P < 0.01$)；与模型组比较，TREM2 抑制剂组大鼠总活动路程和糖水偏好率进一步减少 ($P < 0.05$)，强迫游泳不动时间增加，而 TREM2 激动剂则明显逆转上述抑郁样行为学异常 ($P < 0.05, 0.01$)；与模型组比较，阳性药、左归降糖解郁方均能显著增加大鼠总活动路程和糖水偏好率 ($P < 0.01$)，并减少大鼠强迫游泳不动时间 ($P < 0.01$)。



ZGF-左归降糖解郁方组；与对照组比较：** $P < 0.01$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ，下图同。

ZGF-Zuogui Jiangtang Jieyu Formula; ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 左归降糖解郁方对 DD 大鼠旷场实验中总活动路程、强迫游泳不动时间和糖水偏好率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on total active distance in open field test, immobility time in forced swimming test and sucrose preference rate of DD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 左归降糖解郁方对 DD 大鼠海马神经元突触丢失的影响

高尔基染色检测结果 (图 2) 表明，与对照组比较，模型组大鼠神经网络丰富度降低，突触丢失明显，树突、树突棘断裂，树突棘分支长度减少 ($P < 0.01$)；与模型组比较，TREM2 抑制剂组大鼠上述突触丢失情况进一步加重，而 TREM2 激动剂则明

显改善突触丢失情况，增加树突棘分支长度 ($P < 0.05$)；与模型组比较，阳性药、左归降糖解郁方均能显著改善大鼠海马神经元突触丢失，并增加树突棘分支长度 ($P < 0.01$)。

3.3 左归降糖解郁方对 DD 大鼠海马小胶质细胞 TREM2 蛋白表达的影响

免疫荧光染色检测结果 (图 3-A) 显示，与对

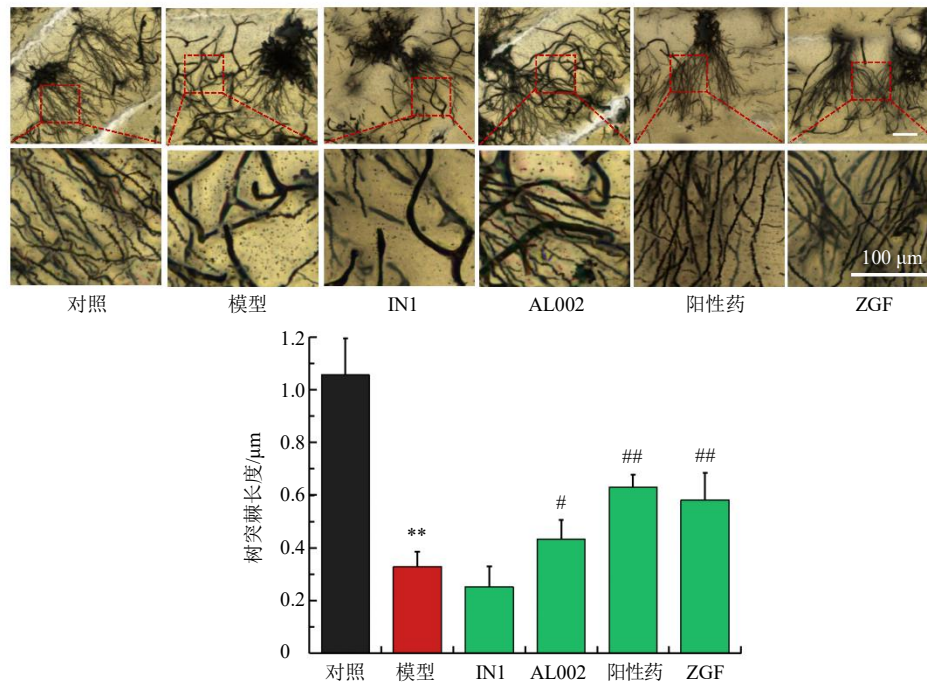
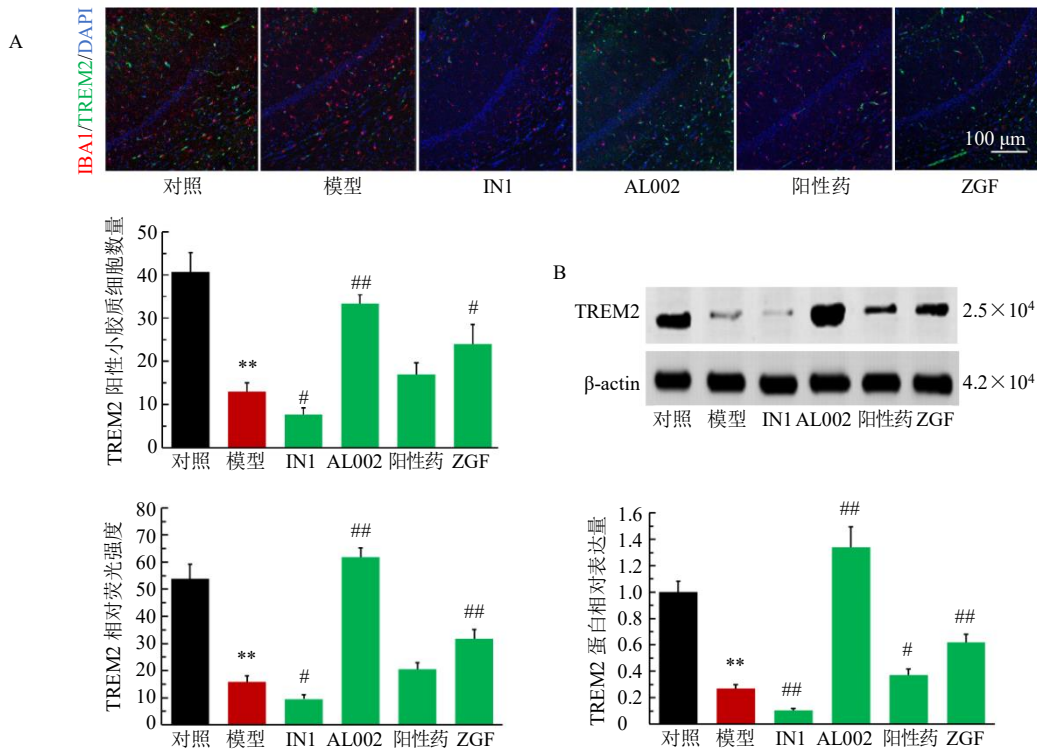


图2 左归降糖解郁方对DD大鼠海马神经元突触丢失的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on hippocampal neurons synaptic loss of DD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-免疫荧光检测海马组织中 TREM2 表达 ($\times 100$); B-Western blotting 检测海马组织中 TREM2 表达。

A-TREM2 expression in hippocampal tissue detected by immunofluorescence ($\times 100$); B-TREM2 expression in hippocampal tissue detected by Western blotting.

图3 左归降糖解郁方对海马组织中 TREM2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on TREM2 protein expression in hippocampus of DD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

照组比较, 模型组大鼠海马组织 TREM2 阳性小胶质细胞数目明显减少 ($P < 0.01$), TREM2 蛋白表达下调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, TREM2 抑制剂、激动剂分别进一步下调和上调大鼠海马小胶质细胞中 TREM2 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 左归降糖解郁方能显著增加 TREM2 阳性小胶质细胞数目 ($P < 0.05$), 上调大鼠海马小胶质细胞中 TREM2 蛋白表达 ($P < 0.01$)。Western blotting 检测结果 (图 3-B) 显示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马组织中 TREM2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, TREM2 抑制剂、激动剂分别下调和上调大鼠海马组织中 TREM2 蛋白表达 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性药、左归降糖解郁方均能显著增加大鼠海马组织中 TREM2 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。以上结果提示左归降糖

解郁方对 DD 大鼠海马小胶质细胞 TREM2 蛋白表达具有明显调控作用。

3.4 左归降糖解郁方对 DD 大鼠海马组织中 C1q 和 PSD95 蛋白表达的影响

免疫荧光染色检测结果 (图 4) 显示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马小胶质细胞中 C1q 蛋白表达上调 ($P < 0.01$), 海马神经元中 PSD95 蛋白表达下调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, TREM2 抑制剂、激动剂分别回调大鼠海马小胶质细胞中 C1q 和海马神经元中 PSD95 蛋白表达 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 左归降糖解郁方能显著下调海马小胶质细胞中 C1q 和上调海马神经元中 PSD95 蛋白表达 ($P < 0.01$)。提示左归降糖解郁方对 DD 大鼠海马组织中突触修剪相关信号蛋白 C1q、PSD95 表达具有明显的调控作用。

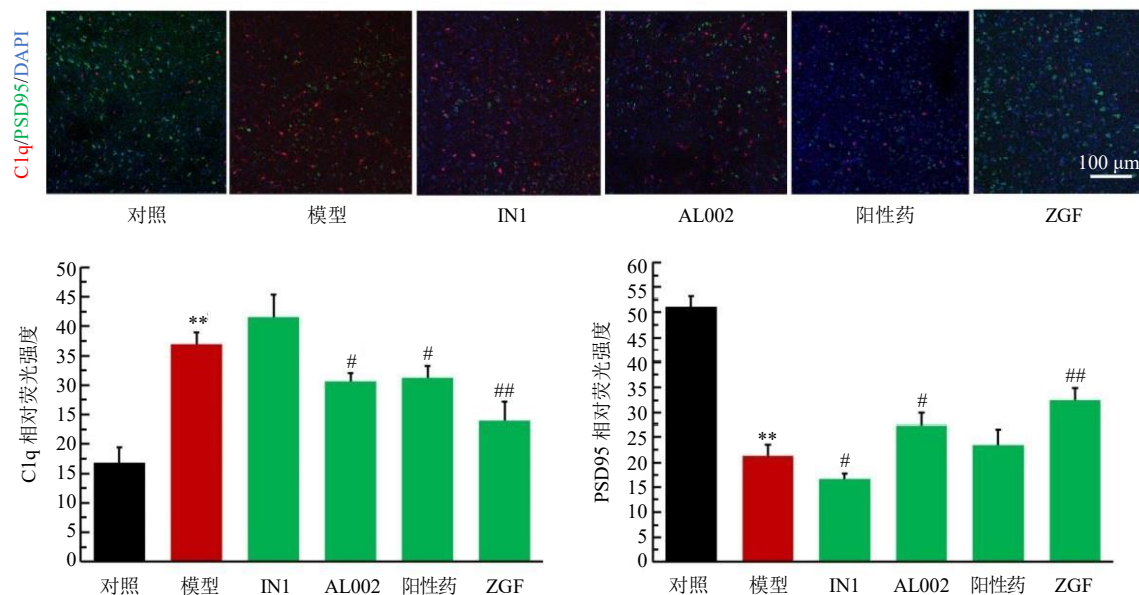


图 4 左归降糖解郁方对海马组织中 C1q 和 PSD95 蛋白表达的影响 ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

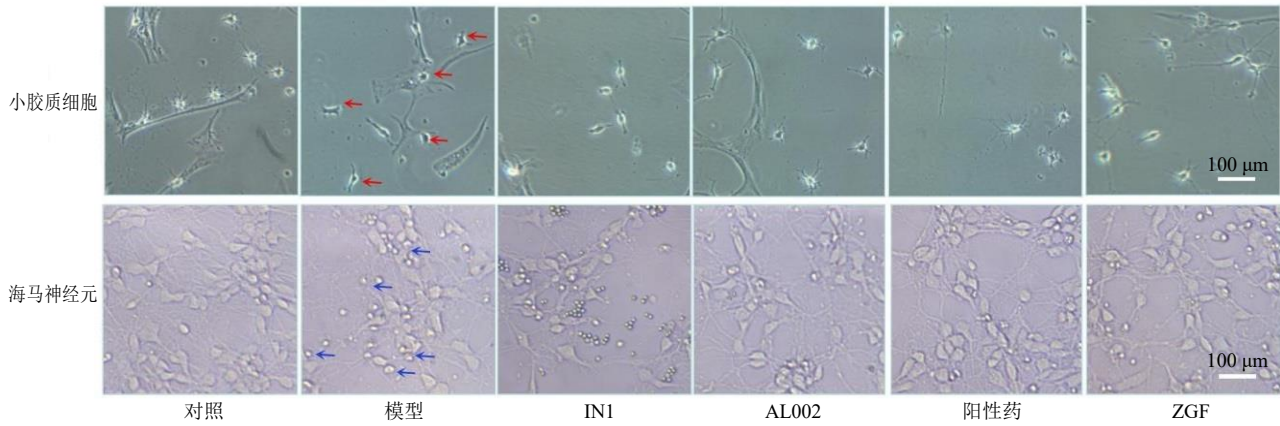
Fig. 4 Effect of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on protein expressions of C1q and PSD95 in hippocampus of DD rats ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.5 左归降糖解郁方含药血清对体外小胶质细胞和海马神经元形态的影响

细胞成像分析检测结果 (图 5) 显示, 与对照组比较, 模型组小胶质细胞异常活化, 分支变短, 海马神经元树突及树突棘断裂, 突触网络丰富度降低; 与模型组比较, TREM2 抑制剂组大鼠上述细胞损伤情况进一步加重, 而 TREM2 激动剂则明显改善细胞损伤情况; 与模型组比较, 阳性药、左归降糖解郁方含药血清均能显著改善大鼠小胶质细胞和海马神经元细胞损伤。

3.6 左归降糖解郁方含药血清对体外海马神经元树突和树突棘的影响

尼氏染色检测结果 (图 6) 显示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马神经元内呈现明显的树突、树突棘断裂, 树突分支长度显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, TREM2 抑制剂、激动剂组海马神经元中上述树突和树突棘损伤情况分别进一步加重或减轻 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 阳性药、左归降糖解郁方含药血清均能显著改善大鼠海马神经元树突和树突棘损伤, 并增加神经元树突分支长



红色箭头表示活化的小胶质细胞，蓝色箭头表示受损的海马神经元。

Red arrow represents activated microglia, and blue arrow represents damaged hippocampal neurons.

图5 左归降糖解郁方含药血清对体外大鼠小胶质细胞和海马神经元形态的影响 (×100)

Fig. 5 Effect of drug-containing serum of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on morphological changes of microglia and hippocampal neuron of rats *in vitro* (× 100)

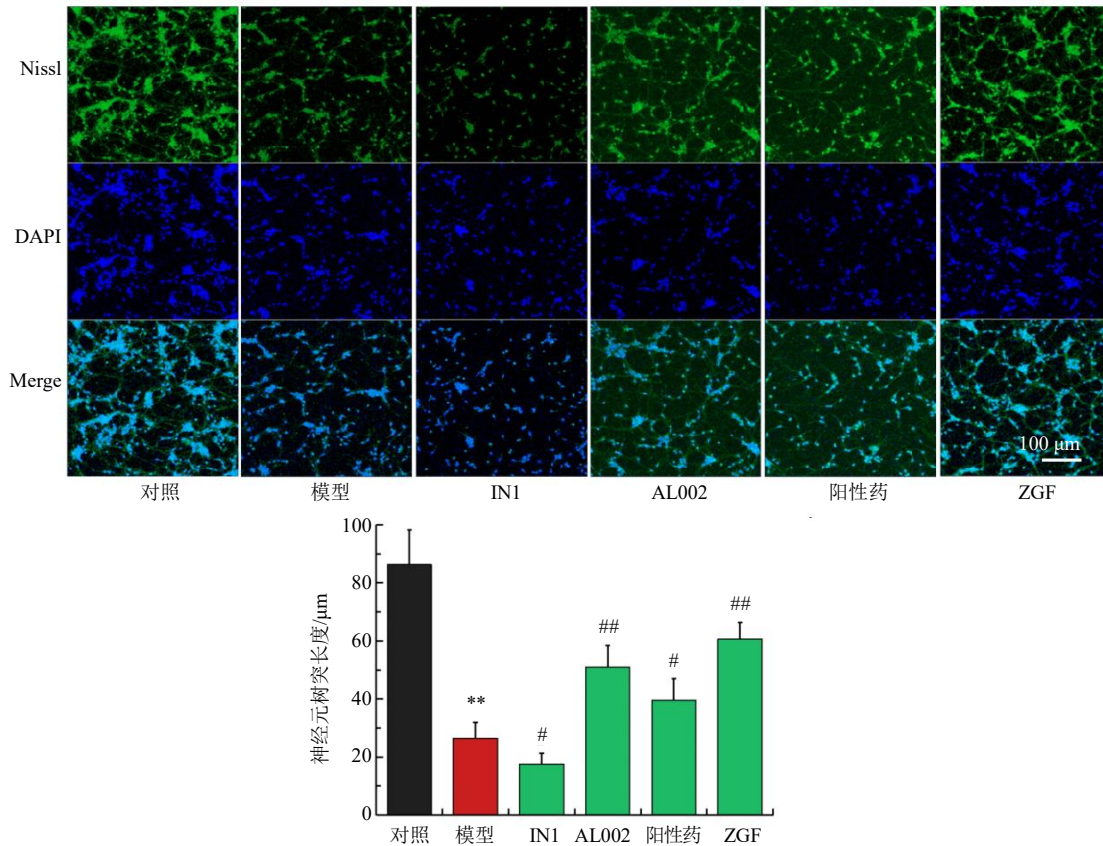


图6 左归降糖解郁方含药血清对体外大鼠海马神经元树突和树突棘的影响 (×100; $\bar{x} \pm s, n = 5$)

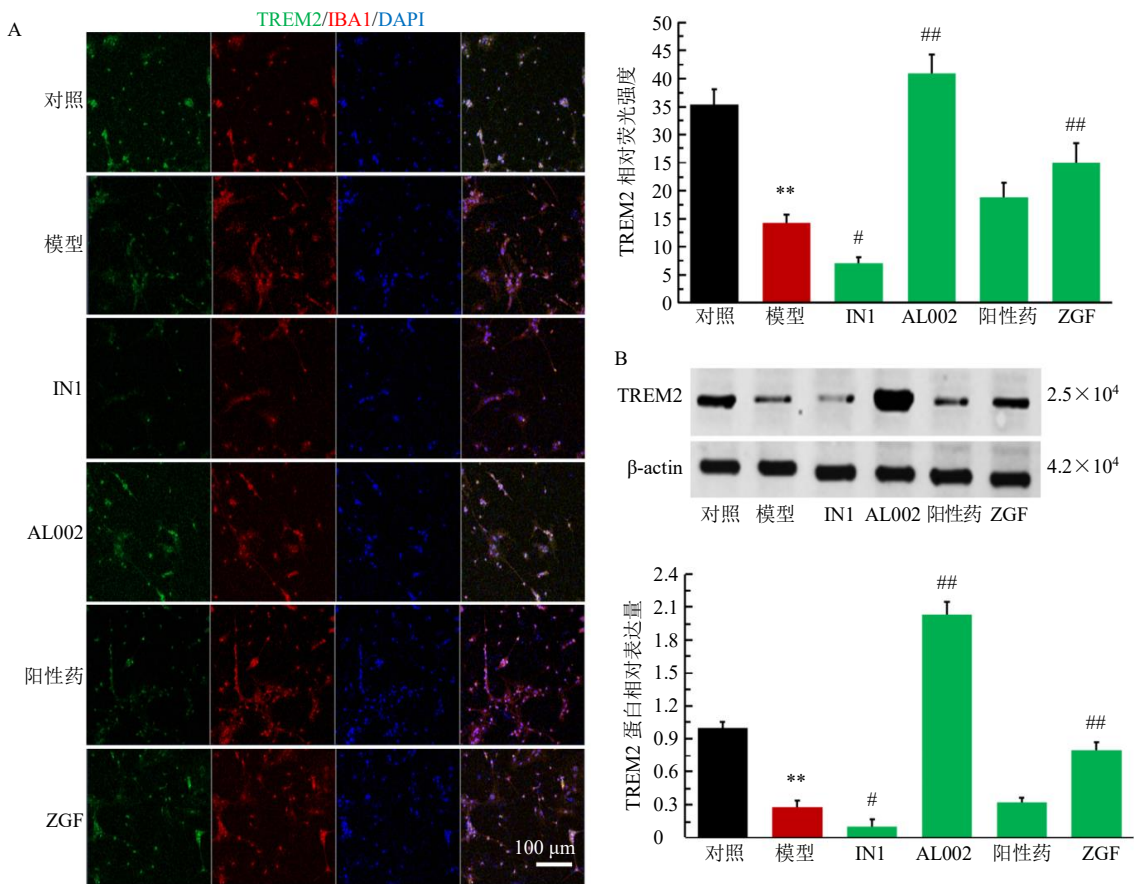
Fig. 6 Effect of drug-containing of serum Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on hippocampal neurons dendrites and dendritic spines of rats *in vitro* (× 100; $\bar{x} \pm s, n = 5$)

度 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.7 左归降糖解郁方含药血清对体外小胶质细胞 TREM2 蛋白表达的影响

免疫荧光染色检测结果 (图 7-A) 显示, 与对

照组比较, 模型组小胶质细胞中 TREM2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, TREM2 抑制剂、激动剂分别进一步下调和上调体外小胶质细胞中 TREM2 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较,



A-免疫荧光检测小胶质细胞中 TREM2 表达 (×100); B-Western blotting 检测小胶质细胞中 TREM2 表达。

A-TREM2 expression in microglia detected by immunofluorescence (× 100); B-TREM2 expression in microglia detected by Western blotting.

图 7 左归降糖解郁方含药血清对体外小胶质细胞中 TREM2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of drug-containing serum of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on protein expressions of TREM2 in microglia *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

左归降糖解郁方含药血清显著增加大鼠海马小胶质细胞中 TREM2 蛋白表达 ($P < 0.01$)。Western blotting 检测结果 (图 7-B) 显示, 与对照组比较, 模型组小胶质细胞中 TREM2 表达下调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, TREM2 抑制剂、激动剂分别下调和上调体外小胶质细胞中 TREM2 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 左归降糖解郁方含药血清显著增加小胶质细胞中 TREM2 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。以上结果提示左归降糖解郁方含药血清对体外模拟 DD 环境下的小胶质细胞中 TREM2 蛋白表达具有明显调控作用。

3.8 左归降糖解郁方含药血清对体外小胶质细胞 C1q 和 PSD95 蛋白表达的影响

免疫荧光染色检测结果 (图 8) 显示, 与对照组比较, 模型组体外小胶质细胞中 C1q 蛋白表达上调、海马神经元中 PSD95 蛋白表达下调 ($P < 0.01$);

与模型组比较, TREM2 抑制剂、激动剂分别逆转小胶质细胞中 C1q 表达增加和海马神经元中 PSD95 表达减少 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 左归降糖解郁方含药血清显著下调小胶质细胞中 C1q 和上调海马神经元中 PSD95 蛋白表达 ($P < 0.01$)。以提示左归降糖解郁方含药血清对体外模拟 DD 环境下的突触修剪相关信号蛋白 C1q、PSD95 表达具有明显的调控作用。

4 讨论

课题组前期研究已证实海马突触微环境损伤是 DD 发生的重要原因, 且免疫受体 CD300f 通过抑制小胶质细胞炎症与糖代谢重编程继而改善 DD 海马突触微环境损伤。研究进一步表明, CD300f 驱动小胶质细胞-海马神经元异常串话介导了海马神经元突触丢失^[11-14], 这提示左归降糖解郁方可能通过调控 CD300f 高度参与了治疗 DD 的病理生理过

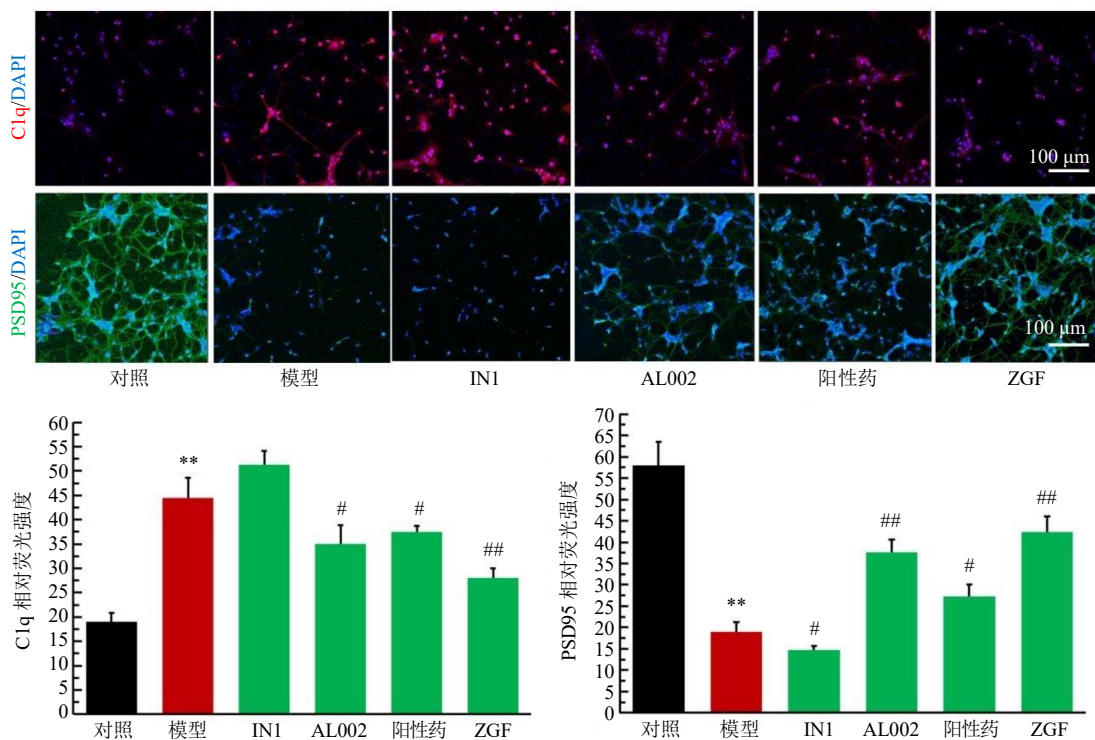


图 8 左归降糖解郁方含药血清对体外小胶质细胞 C1q 和 PSD95 蛋白表达的影响 (×100; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of drug-containing serum of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on protein expressions of C1q and PSD95 in microglia *in vitro* (×100; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

程。CD300f 与 TREM2 均属于髓系细胞（如小胶质细胞、巨噬细胞）表达的免疫调节受体，在神经炎症、抑郁症、衰老及神经退行性疾病中发挥关键作用，尽管二者在结构上存在差异，但在功能上又有着相似性^[25-26]。相关研究发现 TREM2 是一种主要表达于中枢小胶质细胞的细胞表面受体，在调节小胶质细胞能量代谢、神经免疫和突触修剪中起着重要作用，且小胶质细胞前体迁移到大脑，并与神经元进行通讯和串话，参与神经回路和网络连接的建立和成熟^[15-16]，但 TREM2 是否与 DD 海马突触损伤及突触丢失直接有关，目前仍未见相关报道。

最新研究发现，TREM2 的突变或功能缺失会导致神经突触修剪异常，进而影响正常的神经回路形成，其可控制小胶质细胞突触修剪过程，并促进后者过度吞噬，导致神经元突触丢失^[27]。此外大鼠海马胰岛素抵抗后，小胶质细胞表面 TREM2 表达缺失后激活其补体 C1q，引起小胶质细胞突触吞噬增加^[28]；TREM2 基因缺陷小鼠脑内补体的激活明显加剧，小胶质细胞吞噬突触增多，突触的丢失显著增加^[29]。提示小胶质细胞 TREM2/C1q 信号密切参与了海马神经元突触丢失的病理过程，但在糖尿

病状态下，小胶质细胞 TREM2/C1q 通路在海马神经元突触损伤中发挥重要作用。然而，在糖尿病背景下，左归降糖解郁方是否通过调节该通路来改善 DD 相关的海马神经元突触损伤的具体机制尚不明确。

小胶质细胞介导的异常突触修剪是抑郁症发病的核心神经免疫机制之一，在慢性应激状态下，小胶质细胞由静息态转为活化态，并通过多种分子途径过度吞噬神经元突触，导致海马等情绪调控脑区的突触密度下降与神经环路连接紊乱，最终引发快感缺失、认知迟滞与抑郁样行为^[30]。小胶质细胞 C1q 与神经元 PSD95 共定位是目前研究小胶质细胞突触修剪的重要手段，C1q 作为补体级联的起始分子，由活化的小胶质细胞分泌，选择性结合至弱化或冗余的 PSD95 阳性突触，介导其被吞噬清除^[31]。故本研究采用 C1q 与 PSD95 双标检测，以初步探索其对 DD 状态下小胶质细胞突触修剪及吞噬过程的影响。

为了揭示上述机制，首先在动物实验层次，通过 4 周高脂饲料+STZ 注射+28 d CUMS 加孤养复制 DD 大鼠模型，在模型状态下，除左归降糖解郁方给药组外，同时设置了关键靶点的 TREM2 抑制

剂组、TREM2 激动剂组。结果发现,模型组大鼠旷场总活动路程减少、强迫游泳不动时间明显增加,神经元树突、树突棘断裂,树突棘分支长度减少,突触丢失明显,海马小胶质细胞中 TREM2 蛋白表达降低,而 C1q 蛋白表达增加,同时海马神经元中 PSD95 蛋白表达显著减少。而 TREM2 抑制剂 IN1、TREM2 激动剂 AL002 分别加重和减轻上述抑郁样行为异常、突触丢失增加和蛋白表达异常。左归降糖解郁方能明显增加大鼠总活动路程,并减少大鼠强迫游泳不动时间,能显著改善大鼠海马神经元突触丢失,同时上调 DD 大鼠海马小胶质细胞中 TREM2 和海马神经元中 PSD95 蛋白表达,并抑制小胶质细胞中突触修剪相关蛋白 C1q 表达水平。因此,以上体内动物实验结果提示,左归降糖解郁方可能是通过 TREM2/C1q 信号介导的小胶质细胞突触过度修剪,缓解海马神经元突触丢失,最终改善 DD 大鼠抑郁样行为。

为了进一步证实上述结论,在细胞层次也开展了验证,采用高糖联合皮质酮干预作用复制模拟 DD 环境下的体外细胞模型,同时分别辅以 TREM2 抑制剂、TREM2 激动剂干预。结果显示,模型组小胶质细胞和海马神经元细胞形态结构明显损伤,呈现明显的突触丢失情况,树突、树突棘断裂,同时小胶质细胞中 TREM2 表达减少而 C1q 表达增高,海马神经元中 PSD95 表达下降。TREM2 抑制剂 IN1、TREM2 激动剂 AL002 分别加重和缓解上述异常改变,而左归降糖解郁方含药血清也可显著上调小胶质细胞中 TREM2 和海马神经元中 PSD95 蛋白表达,并下调小胶质细胞中突触修剪相关蛋白 C1q 表达水平。故细胞实验与动物实验的结果相一致。然而由于体外细胞模型的局限性,高糖联合皮质酮干预无法完全模拟 DD 临床患者体内的真实病理状态,后续研究将基于 DD 的临床致病因素、病灶、病程等多环节,从病理形态损伤、葡萄糖升高、胰岛素降低、单胺神经递质下降及神经元突触损伤等多维层面,来进一步证实本研究的假说。

本研究采用小胶质细胞 C1q 与海马神经元 PSD95 双标检测,初步探索了左归降糖解郁方对 DD 状态下小胶质细胞突触修剪及吞噬过程的影响,为了进一步明确该过程的具体调控机制,后续研究拟采用活细胞工作站,通过抗 C1q(小胶质细胞来源)与抗 PSD95(神经元突触后密度蛋白)抗体共染,同时采用活体双光子成像实时追踪小胶

质细胞动态修剪与吞噬突触的过程,开展突触“修剪-吞噬”动态过程的可视化研究。此外,为了深入挖掘左归降糖解郁方的药效物质基础,后续研究将采用网络药理学、代谢组学、转录组学和蛋白组学联合分子对接技术以明确芍药苷、丹酚酸 B、毛蕊异黄酮苷等关键活性成分与重要靶点 TREM2、C1q 的直接作用。

综上,本研究通过体内和体外的双重验证明确了左归降糖解郁方能有效改善 DD 海马神经元突触丢失,进而缓解大鼠抑郁样行为,其机制可能与调控 TREM2/C1q 信号介导的小胶质细胞突触过度修剪有关。但由于 TREM2 抑制剂与激动剂的特异性作用欠佳,无法充分明确左归降糖解郁方通过调控 TREM2/C1q 信号介导的小胶质细胞突触过度修剪进而改善 DD 大鼠抑郁样行为,故未来研究将针对关键靶点 TREM2 和 C1q,在动物实验中采用海马区注射 AAV-TREM2 和 AAV-C1q 敲低及其过表达病毒,在细胞实验中进行 siRNA 靶向干扰沉默或慢病毒转染过表达 TREM2 和 C1q,进一步证实 TREM2/C1q 信号在左归降糖解郁方调控 DD 小胶质细胞突触修剪中的重要作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Belko S, Hutchinson M, Hayden G, et al. Co-designing diabetes care with patients [J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2024, 18(1): 53-58.
- [2] Bai S, Wang J S, Liu J T, et al. Analysis of depression incidence and influence factors among middle-aged and elderly diabetic patients in China: Based on CHARLS data [J]. *BMC Psychiatry*, 2024, 24(1): 146.
- [3] Li S X, Yang D, Zhou X H, et al. Neurological and metabolic related pathophysiologicals and treatment of comorbid diabetes with depression [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(4): e14497.
- [4] Gois C, Dias V V, Carmo I, et al. Treatment response in type 2 diabetes patients with major depression [J]. *Clin Psychol Psychother*, 2014, 21(1): 39-48.
- [5] 蔺晓源, 韩远山, 孟盼, 等. 糖尿病并发抑郁症“虚、瘀、郁”的中医病机探讨 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(8): 1942-1943.
- [6] Li Z R, Han Y S, Liu Z, et al. GR/NF- κ B signaling pathway regulates hippocampal inflammatory responses in diabetic rats with chronic unpredictable mild stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 895: 173861.
- [7] Yang H, Ling J, Meng P, et al. Activation of hippocampal

- IR/IRS-1 signaling contributes to the treatment with Zuogui Jiangtang Jieyu Decoction on the diabetes-related depression [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6688723.
- [8] 刘洋, 李萍, 杨蕙, 等. 左归降糖解郁方改善糖尿病并发抑郁症大鼠 *N*-甲基 *D*-天冬氨酸受体过激致海马突触损伤的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(19): 6323-6335.
- [9] Price R B, Duman R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: An integrative model [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(3): 530-543.
- [10] Lago N, Kaufmann F N, Negro-Demontel M L, *et al*. CD300f immunoreceptor is associated with major depressive disorder and decreased microglial metabolic fitness [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(12): 6651-6662.
- [11] 刘检, 杨蕙, 赵洪庆, 等. 基于小胶质细胞-神经元串扰信号 CD300f/TLR4 探讨左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马突触微环境损伤的保护作用及机制 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(17): 4597-4606.
- [12] 刘检, 赵洪庆, 唐林, 等. 左归降糖解郁方调控小胶质细胞 CD300f 改善糖尿病并发抑郁症海马突触微环境损伤的机制研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(17): 5841-5852.
- [13] 刘检, 唐林, 赵洪庆, 等. 左归降糖解郁方调控 CD300f/GLUT1 信号通路改善糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经元突触损伤的作用机制 [J]. *北京中医药大学学报*, 2024, 47(11): 1573-1584.
- [14] 刘检, 蔺晓源, 龙红萍, 等. 左归降糖解郁方通过 CD300f/GLUT1 信号调控小胶质细胞糖代谢改善糖尿病并发抑郁症海马突触微环境损伤机制 [J]. *中医基础医学杂志*, 2025, 31(10): 1752-1759.
- [15] Colonna M. The biology of TREM receptors [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(9): 580-594.
- [16] Filipello F, Morini R, Corradini I, *et al*. The microglial innate immune receptor TREM2 is required for synapse elimination and normal brain connectivity [J]. *Immunity*, 2018, 48(5): 979-991.
- [17] 张驰, 周思倩, 李金来, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的左归降糖解郁方体内成分分析 [J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(2): 228-240.
- [18] 李萍, 刘洋, 邹蔓姝, 等. 基于 CX3CL1-CX3CR1 轴探讨左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症模型大鼠的神经保护作用及机制 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(21): 5822-5829.
- [19] Yang H, Tang L, Qu Z, *et al*. Hippocampal insulin resistance and the Sirtuin 1 signaling pathway in diabetes-induced cognitive dysfunction [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(12): 2465-2474.
- [20] Liu J, Liu L, Han Y S, *et al*. The molecular mechanism underlying mitophagy-mediated hippocampal neuron apoptosis in diabetes-related depression [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(15): 7342-7353.
- [21] Qin Z S, Shi D D, Li W Q, *et al*. Berberine ameliorates depression-like behaviors in mice via inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation and preventing neuroplasticity disruption [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 54.
- [22] Liu J, Wang Y H, Li W, *et al*. Structural and functional damage to the hippocampal neurovascular unit in diabetes-related depression [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(2): 289-297.
- [23] Kaeck S, Banker G. Culturing hippocampal neurons [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(5): 2406-2415.
- [24] 刘检, 刘林, 唐林, 等. 左归降糖解郁方对自噬介导的糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经血管单元中神经元损伤的保护作用及其机制 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2420-2427.
- [25] Evans F, Alí-Ruiz D, Rego N, *et al*. CD300f immune receptor contributes to healthy aging by regulating inflammaging, metabolism, and cognitive decline [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(10): 113269.
- [26] Pocock J, Vasilopoulou F, Svensson E, *et al*. Microglia and TREM2 [J]. *Neuropharmacol*, 2024, 257: 110020.
- [27] Tagliatti E, Desiato G, Mancinelli S, *et al*. Trem2 expression in microglia is required to maintain normal neuronal bioenergetics during development [J]. *Immunity*, 2024, 57(1): 86-105.
- [28] Scott-Hewitt N, Perrucci F, Morini R, *et al*. Local externalization of phosphatidylserine mediates developmental synaptic pruning by microglia [J]. *EMBO J*, 2020, 39(16): e105380.
- [29] Zhong L, Sheng X, Wang W B, *et al*. TREM2 receptor protects against complement-mediated synaptic loss by binding to complement C1q during neurodegeneration [J]. *Immunity*, 2023, 56(8): 1794-1808.
- [30] Hao W Z, Ma Q Y, Wang L, *et al*. Gut dysbiosis induces the development of depression-like behavior through abnormal synapse pruning in microglia-mediated by complement C3 [J]. *Microbiome*, 2024, 12(1): 34.
- [31] Yang J L, Yuan S L, Jian Y, *et al*. Aerobic exercise regulates GPR81 signal pathway and mediates complement-microglia axis homeostasis on synaptic protection in the early stage of Alzheimer's disease [J]. *Life Sci*, 2023, 331: 122042.