

• XXXX •

基于粪便代谢组学探究开心散调控肠脑轴5-羟色胺系统 抗抑郁的作用机制

董爱¹, 白云凤², 李桢琳¹, 唐雅楠¹, 王春国^{3*}, 徐砚通^{3*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102488;
3. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 102488)

[摘要] 目的:通过粪便代谢组学分析并考察肠脑轴中5-羟色胺(5-HT)系统的变化,探讨开心散的抗抑郁机制。方法:采用慢性束缚应激(CRS)模型评价开心散抗抑郁药效,ICR小鼠设立空白组,模型组,氟西汀组(0.01 g·kg⁻¹),开心散低、中、高剂量组(2.5、5.0、10.0 g·kg⁻¹),除空白组外,各组连续28 d束缚应激造模,同时预防性灌胃给药,应用糖水偏好、强迫游泳、悬尾和旷场实验评价抗抑郁药效。应用超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱质谱法(UPLC-LTQ-Orbitrap MS)考察小鼠肠道粪便代谢组的变化,从代谢轮廓、差异代谢物和通路富集分析开心散治疗后的改变。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清、结肠和前额皮层5-HT含量。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠色氨酸羟化酶1(TPH1)、单胺氧化酶A(MAOA)、5-HT转运体(SERT)、5-HT受体4(5-HTR₄)和前额皮层色氨酸羟化酶2(TPH2)、MAOA、SERT、5-HT受体2A(5-HTR_{2A})蛋白的表达水平。结果:与空白组比较,模型组糖水偏好率显著降低($P<0.01$),强迫游泳和悬尾的不动时间均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,开心散中、高剂量组小鼠糖水偏好率明显提高($P<0.05$, $P<0.01$),强迫游泳不动时间显著降低($P<0.01$),开心散各剂量组小鼠悬尾不动时间均显著降低($P<0.01$)。粪便代谢组学分析显示,开心散给药组与模型组间共有7个差异代谢物,代谢通路富集到亚油酸氧脂代谢等25条代谢物通路,京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集到色氨酸代谢和类固醇激素生物合成2条通路。Western blot实验验证显示,与空白组比较,模型组和开心散低剂量组血清5-HT含量明显下调($P<0.05$);与模型组比较,开心散中、高剂量组有增高趋势,但差异无统计学意义。在结肠组织中,与空白组比较,模型组TPH1、SERT、5-HTR₄、MAOA蛋白表达水平及5-HT含量明显下调($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,开心散各剂量组TPH1、SERT蛋白表达水平明显上调($P<0.05$, $P<0.01$),开心散高剂量组5-HT含量明显上调($P<0.05$)。在大脑前额皮层,与空白组比较,模型组TPH2、MAOA蛋白表达水平及5-HT含量明显下调($P<0.05$),SERT、5-HTR_{2A}蛋白表达水平显著上调($P<0.01$);与模型组比较,开心散各剂量组的TPH2、MAOA蛋白表达水平及5-HT含量显著上调($P<0.01$),SERT、5-HTR_{2A}蛋白表达水平明显下调($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:开心散显著改善CRS小鼠的抑郁样行为,其抗抑郁作用机制与调节粪便代谢组,改善肠脑轴5-HT系统有关。

[关键词] 开心散; 抗抑郁; 粪便代谢组; 肠脑轴; 5-羟色胺系统

[中图分类号] R242;R749;R277.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(XXXX)XX-0001-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260566

[网络出版地址]

[网络出版日期] XXXX-XX-XX **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Exploring Antidepressant Mechanism of Kaixin San by Regulating 5-Hydroxytryptamine System in Gut-brain Axis Based on Fecal Metabolomics

DONG Ai¹, BAI Yunfeng², LI Chenglin¹, TANG Yanan¹, WANG Chunguo^{3*}, XU Yantong^{3*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;
2. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 3. Beijing

[收稿日期] 2026-03-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82374076)

[第一作者] 董爱,在读硕士,从事中药抗抑郁研究,E-mail:moonai0800@163.com

[通信作者] *徐砚通,博士,研究员,博士生导师,从事中药抗抑郁研究,E-mail:tonyxu2015@sina.com;

*王春国,硕士,高级实验师,从事中药成分质谱分析方法,E-mail:chunguowang@bucm.edu.cn

Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antidepressant mechanism of Kaixin San (KXS) by determining the alterations in the fecal metabolome and the 5-hydroxytryptamine (5-HT) system in the gut-brain axis. **Methods:** The antidepressant efficacy of KXS was evaluated via the chronic restraint stress (CRS) model. ICR mice were assigned into six groups: control, model, fluoxetine (0.01 g·kg⁻¹), and low-, medium-, and high-dose (2.5, 5.0, 10.0 g·kg⁻¹, respectively) KXS groups. Except the control group, the other groups were subjected to restraint stress for 28 consecutive days while simultaneously receiving preventive gavage of test drugs. Antidepressant effects were assessed by the sucrose preference test (SPT), forced swimming test (FST), tail suspension test (TST), and open field test (OFT). The fecal metabolome of mice was analyzed by UPLC-LTQ-Orbitrap MS, which examined changes in metabolic profiles, differential metabolites, and associated metabolic pathways after KXS treatment. The 5-HT levels in the serum, colon, and cerebral cortex were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blotting was used to determine the expression of tryptophan hydroxylase (TPH) 1 in the colon and TPH2 in the prefrontal cortex, monoamine oxidase A (MAOA) and serotonin transporter (SERT) in both colon and prefrontal cortex, as well as 5-HT receptor 4 (5-HTR₄) in the colon and 5-HT receptor 2A (5-HTR_{2A}) in the prefrontal cortex. **Results:** Compared with the control group, the model group showed a decreased sucrose preference rate ($P<0.01$) and increased immobility time in both the FST and TST ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the medium- and high-dose KXS groups exhibited increased sucrose preference rates ($P<0.05$, $P<0.01$) and reduced the immobility time in FST ($P<0.01$). KXS at all doses significantly decreased the immobility time in TST ($P<0.01$). Fecal metabolomics analysis identified 7 differential metabolites between the KXS groups and the model group. Metabolic pathway enrichment analysis identified 25 pathways, such as linoleic acid oxylipin metabolism. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment further identified two pathways: tryptophan metabolism and steroid biosynthesis. Serum 5-HT levels were decreased in the model group and the low-dose KXS group compared with the control group ($P<0.05$). Compared with the model group, the medium- and high-dose KXS groups showed an increasing trend of serum 5-HT level but did not reach statistical significance. Compared with the control group, the model group exhibited downregulated expression of TPH1, SERT, 5-HTR₄, MAOA as well as a declined 5-HT level in the colon ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, KXS at all the doses upregulated TPH1 and SERT expression ($P<0.05$, $P<0.01$), and high-dose KXS increased the 5-HT content ($P<0.05$) in the colon. Compared with the control group, the model group exhibited downregulated TPH2 and MAOA expression and reduced 5-HT content ($P<0.05$) and upregulated SERT and 5-HTR_{2A} expression ($P<0.01$) in the prefrontal cortex. Compared with the model group, KXS at all doses upregulated TPH2 and MAOA expression and 5-HT content ($P<0.01$) and downregulated SERT and 5-HTR_{2A} expression ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** KXS significantly ameliorated depression-like behaviors in mice subjected to CRS by regulating the fecal metabolome and the 5-HT system in the gut-brain axis.

[Keywords] Kaixin San; antidepressant; fecal metabolome; gut-brain axis; 5-hydroxytryptamine (5-HT) system

抑郁症严重威胁人类健康,目前全球患者超过3.22亿人^[1],中国患者超过9 500万人^[2],给社会和家庭造成了沉重负担。近年来,肠脑轴(GBA)研究^[3]为抑郁症的发生机制与治疗策略提供了新视角。在抑郁症GBA机制研究中,首先,肠道微生物生态系统的改变是重点关注对象。肠道微生物生态系统由肠道微生物群落和宿主肠道环境共同构成^[4]。目前大量研究报道了肠道微生物群落改变在多种疾病中的重要作用^[4];相较而言,肠道环境中粪便代谢组学研究报道很少^[5]。粪便代谢组学分析能够反映肠道微生物生态系统内代谢物的变化,有助于发现抑郁症发生及治疗过程中的关键肠道代谢物。其次,肠脑通讯途径是重点研究机制,涉及神经、循环、内分泌、免疫及代谢等多种方式,在肠和脑之间构成双向互动网络^[3]。最后,脑内改变是关键研究内容。抑郁症的临床核心症状与脑功能直接相关,经典抑郁症发生机制学说,如单胺类和谷氨酸神经递质系

统、神经营养因子及突触可塑性改变等从不同侧面反映了脑内改变状况。

开心散是中医治疗情志病的经典名方,最早记载于唐代孙思邈所撰《备急千金要方》,已被列入《古代经典名方目录(第一批)》。现代临床和临床前研究证实,开心散具有显著抗抑郁效果,且对GBA具有调节作用^[6-7]。研究显示,开心散在慢性不可预期温和应激(CUMS)抑郁动物模型中,可显著增加糖水消耗量,恢复脑内5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)水平^[8-9];调节脑内色氨酸羟化酶(TPH)、单胺氧化酶A(MAOA)、5-HT转运体(SERT)信使核糖核酸(mRNA)表达,以及突触后5-HT受体2A(5-HTR_{2A})、5-HTR_{2B} mRNA和蛋白水平^[10-11]。其次,开心散能显著增加CUMS抑郁小鼠肠道中粪杆菌属、双歧杆菌属等有益菌的丰度,同时降低螺杆菌属等潜在致病菌的丰度,是其发挥抗抑郁作用的关键环节^[12]。同时,

开心散改善抑郁小鼠因氟西汀导致的胃肠道动力与肠道吸收功能损伤,其机制可能与调节小肠中脑肠肽的表达,抑制肠道绒毛损伤及肠道组织凋亡有关^[13]。此外,开心散调控肠脑通讯途径,研究证实开心散能显著改善肠道菌群失衡,降低肠道-血清-脑内炎症因子的表达^[14]。迄今为止,开心散抗抑郁中肠道粪便代谢物改变及相关作用机制尚未见报道。粪便代谢组学直接反映肠道微环境的功能状态,是探究GBA调控机制的重要切入点。因此,本文基于GBA作用特征,采用超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱质谱法(UPLC-LTQ-Orbitrap MS)检测结肠粪便代谢物以反映肠道代谢微环境的改变,根据肠道粪便代谢组学富集结果发现关键信号通路,进而对关键信号通路作用机制进行验证,揭示开心散抗抑郁的GBA机制。

1 材料

1.1 仪器 EthoVision XT型视频追踪系统(荷兰Noldus信息技术公司),XR-XZ301型小鼠旷场装置、XR-XX203型小鼠悬尾装置、XR-XQ202型小鼠强迫游泳装置(上海欣软信息科技有限公司),Epoch 2型全波长酶标仪(美国Bio Tek公司),Amersham Imager 680型化学发光成像仪(美国Cytiva公司),3 000 UHPLC Plus Focused型超高效液相色谱仪、LTQ-Orbitrap XL型质谱仪(美国Thermo Scientific公司),Millipore Synergy UV型超纯水机(美国Millipore公司)、DYCZ-MINI4型电泳仪、DYCZ-TRANS2型转膜仪(北京六一生物科技有限公司)。

1.2 药物 人参片(批号20211218)、制远志(批号20220223)、茯苓(批号20211223)、石菖蒲(批号20210315)均购自北京本草方源药业集团有限公司,经北京中医药大学中药学院李卫东教授分别鉴定均符合2025年版《中华人民共和国药典》的质量规范。

1.3 试剂 氟西汀(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号F189157,规格5 g/瓶);蔗糖(美国Sigma公司,货号V900116-500G);小鼠5-HT酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,货号JL12087);放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为P0013B、ST506、P0010);色氨酸羟化酶1(TPH1)抗体、TPH2抗体(美国Cell Signaling Technology公司,货号分别为12339S、51124S);SERT抗体、

MAOA抗体、5-HTR_{2A}抗体、5-HTR₄抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔重组二抗、HRP标记山羊抗小鼠重组二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为29186-1-AP、10539-1-AP、26438-1-AP、21165-1-AP、29186-1-AP、RGAM001);甲酸、甲醇、乙腈均为质谱级,水为超纯水,其余试剂均为分析级。

1.4 动物 SPF级雄性ICR小鼠72只,体质量18~22 g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产合格证号SCXK(京)2019-0010;饲养于北京中医药大学屏障环境动物室,使用许可证号SYXK(京)2023-0011,动物饲养条件温度18~25℃,相对湿度40%~70%,光照周期明暗时间12 h,自由饮食饮水。

1.5 伦理 动物实验设计经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准,符合动物伦理学要求,批准号BUCM-2023041701-2041。

2 方法

2.1 药液制备 开心散浸膏制备方法同文献报道^[15],将开心散药材远志、人参、茯苓、石菖蒲按照质量比1:1:2:1称取^[16],加入8倍量蒸馏水煎煮2次,每次1 h,水煎液滤过后合并,经真空浓缩后,于真空干燥箱中70℃干燥成干浸膏(出膏率22.1%),打粉过筛后备用。用时以蒸馏水和干膏粉配制成混悬液,存于4℃冰箱,每3 d重新配制。

2.2 分组、造模及给药 根据开心散人用日服15 g生药^[16],按人体质量70 kg,人与小鼠换算系数选取11.67,换算为小鼠日用量为生药2.50 g·kg⁻¹,作为临床等效剂量,再根据预实验结果,确定开心散低、中、高剂量分别为临床等效剂量的1、2、4倍,即。将72只雄性ICR小鼠随机分为空白组,模型组,氟西汀组(0.01 g·kg⁻¹),开心散低、中、高剂量组(2.5、5.0、10.0 g·kg⁻¹)。其余给药组按剂量每日灌胃给药1次,空白组和模型组每日灌胃等体积蒸馏水。每次给药后,除空白组外,各组每日束缚于50 mL塑料离心管自制束缚器(内径3 cm×长度11 cm,尖端、中部和后部均留有数个透气孔)中4 h,持续28 d后,进行糖水偏好、强迫游泳、悬尾和旷场行为学检测。与空白组比较,模型组小鼠糖水偏好率显著降低、强迫游泳和悬尾不动时间显著增加,表明慢性束缚应激(CRS)模型建立成功。

2.3 小鼠行为学评价

2.3.1 糖水偏好实验 将1%蔗糖水和动物饮用水分别装入小鼠饮用水瓶,同时供小鼠自由饮用,首

先对小鼠进行糖水适应训练48 h,期间在24 h时调换1%蔗糖水和饮用水位置;然后禁食、水24 h,第2日20:00至次日8:00进行糖水偏好测试,实验开始前和结束后分别称量记录2个水瓶质量,按照公式计算糖水偏好率。糖水偏好率=糖水消耗量/(糖水消耗量+饮用水消耗量)×100%。

2.3.2 强迫游泳实验 实验前小鼠在测试房间提前适应1 h(悬尾和旷场实验相同),保证环境安静且光线昏暗。将小鼠置于水深12 cm,水温(25±1)℃的透明圆筒(高25 cm,直径15 cm)中6 min,采用EthoVision XT视频追踪系统记录小鼠后4 min累计静止时间,当小鼠在水中停止游动和挣扎,或呈漂浮状态、仅进行微小的肢体运动状态以保持头部浮在水面认定为静止时间。

2.3.3 悬尾实验 将小鼠尾尖部(约1 cm处)用透明胶带固定在横杆上倒挂,头部距桌面约20 cm,小鼠之间用挡板隔开阻碍其视线接触。采用EthoVision XT视频追踪系统记录在6 min内累计静止时间。当小鼠在空中停止挣扎动作,或仅进行微小的肢体运动状态认定为静止时间。

2.3.4 旷场实验 在旷场箱(50 cm×50 cm×50 cm)上方中央安装摄像头,旷场箱底部在电脑上分为25个小正方形格子(10 cm×10 cm),中央4个正方形格子定义为中心区,其余属于角落区。采用EthoVision XT视频追踪系统分析10 min内小鼠在旷场箱内活动总路程、累计静止时间、中心区累计静止时间、角落区累计静止时间。

2.4 样本采集 在行为学检测完毕后,常规眼球取血,血样在室温静置2 h后在3 500 r·min⁻¹(离心半径10 cm,下同),4℃条件下离心,吸取血清,存放于-80℃冰箱备用。将小鼠脱臼处死后,在冰盒上迅速取出脑组织,分离前额皮层,液氮速冻;取小鼠结肠收集肠内成形粪便,用生理盐水冲洗结肠,收集1~2 cm肠段,存放于-80℃冰箱备用。

2.5 代谢组学分析

2.5.1 样本处理 称取空白组、模型组、氟西汀组和开心散高剂量组小鼠粪便样品50 mg,加入提取液(甲醇-水3:1)1 000 μL,4℃研磨,12 000 r·min⁻¹离心15 min,待上清液挥干后加水复溶,然后加入等量乙酸乙酯萃取,取上清液,待乙酸乙酯挥干后,加入甲醇50 μL复溶。每检测10个样本插入1个混合样本作质量控制(QC)样本。

2.5.2 检测条件 色谱条件为ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),以流动

相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~2 min,30%B;2~12 min,30%~85%B;12~14 min,85%B;14~14.1 min,85%~30%B;14.1~17 min,30%B),流速0.3 mL·min⁻¹,柱温35℃,进样量3 μL。质谱条件为加热电喷雾离子源(HESI)正、负离子模式检测,离子源温度350℃,正负离子源电压分别为4 kV、-3 kV,毛细管电压35 V,管透镜电压110 V,鞘气和辅助气均为高纯氮气(纯度>99.99%),正负离子模式鞘气流速分别为40、30 arb,辅助气流速分别为20、10 arb。正负离子数据采集均使用傅里叶变换高分辨全扫方式,分辨率30 000,以及数据依赖二级扫描(dd-MS²),分辨率17 500,碎裂方式为碰撞诱导解离(CID),碰撞能量NCE35。

2.5.3 数据处理 将获得的质谱原始数据导入Compound Discoverer 3.2软件进行离子峰的识别、筛选、滤噪、归一化及化合物鉴定等处理,以降低仪器信号漂移对数据质量的影响。进而采用SIMCA14.1进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)。以差异倍数(FC)≥1.5或≤0.67,变量重要性投影(VIP)值>1,P<0.05,错误发现率(FDR)<0.05,筛选差异代谢物。该筛选策略为代谢组学常用方法^[17-18]。差异代谢产物的鉴定使用mz Cloud(<https://www.mzcloud.org/>)进行谱图匹配,并结合自建代谢物数据库。获得的差异成分运用京都基因与基因组百科全书(KEGG,<http://www.genome.jp/kegg/>)、MetaboAnalyst 5.0(<http://www.metaboanalyst.ca/>)等代谢途径富集分析工具。

2.6 ELISA检测小鼠血清、结肠、前额皮层组织中5-HT含量 每组随机取8个独立小鼠的血清、结肠、前额皮层组织,冰上解冻,加入9倍量体积预冷的磷酸盐缓冲液(PBS),充分研磨,4℃、5 000 r·min⁻¹,离心10 min,取上清,根据试剂盒说明书检测5-HT含量。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠结肠、前额皮层组织相关蛋白表达 每组随机取8个独立小鼠的结肠、前额皮层组织,冰上解冻,加入预冷的RIPA裂解液进行匀浆,4℃,12 000 r·min⁻¹,离心30 min,取上清,按照BCA法测定蛋白浓度。上样后依次进行电泳、转膜、5%脱脂奶粉室温封闭2 h后加入SERT(1:500)、MAOA(1:1 000)、TPH1(1:500)、TPH2(1:1 000)、5-HTR₄(1:1 000)、5-HTR_{2A}(1:500)、GAPDH(1:10 000)一抗,4℃孵育过夜。次日,用TBST缓冲液洗膜3次,室温孵育二抗(1:10 000)1 h,漂洗后曝光。采用ImageJ 6.0分析蛋白条带。

2.8 统计学分析 采用 Graphpad Prism 8.0 进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。首先对数据进行正态性检验,数据满足正态分布时采用单因素方差分析;若不符合正态分布,采用非参数检验。以检验水平 $\alpha=0.05, P<0.05$ 即差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 开心散对抑郁小鼠的体质量影响 在 0 d 时,各组小鼠体质量差异无统计学意义;在 7、14、21 d 时,与空白组比较,各组小鼠体质量小鼠均有显著降低 ($P<0.01$);在 28 d 时,在小鼠控食控水后,与空白组比较,模型组及开心散各剂量组小鼠体质量显著下降 ($P<0.01$),氟西汀组有所下降,但差异无统计学意义。在 7、14、21、28 d 时,与模型组比较,各

给药组体质量均有回升,但仅在 7 d 时,氟西汀组小鼠体质量明显增加 ($P<0.05$)。见表 1。

3.2 开心散对抑郁小鼠行为学指标的影响 与空白组比较,模型组小鼠糖水偏好率显著降低 ($P<0.01$),强迫游泳和悬尾的不动时间明显增加 ($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,氟西汀组,开心散中、高剂量组小鼠糖水偏好率明显提高 ($P<0.05, P<0.01$),强迫游泳不动时间显著降低 ($P<0.01$),氟西汀组、开心散各剂量组小鼠悬尾不动时间显著降低,差异有统计学意义 ($P<0.01$)。各组小鼠在旷场的总路程、累计不动时间、中心区停留时间、角落区停留时间与空白组小鼠比较差异无统计学意义。见表 2、表 3。

表 1 开心散对抑郁小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 Effect of Kaixin San on body weight in depressed mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
空白组		23.74±0.21	32.37±0.40	35.37±0.43	37.54±0.40	32.03±0.46
模型组		23.74±0.19	28.04±0.32 ¹⁾	30.89±0.43 ¹⁾	32.55±0.60 ¹⁾	27.95±0.60 ¹⁾
氟西汀组	0.01	23.32±0.22	29.64±0.35 ^{1,2)}	32.27±0.37 ¹⁾	34.17±0.36 ¹⁾	29.83±0.35
开心散低剂量组	2.5	23.68±0.25	28.97±0.32 ¹⁾	31.84±0.48 ¹⁾	33.61±0.53 ¹⁾	28.09±0.50 ¹⁾
开心散中剂量组	5.0	23.51±0.34	28.78±0.36 ¹⁾	31.13±0.32 ¹⁾	32.38±0.44 ¹⁾	28.41±0.37 ¹⁾
开心散高剂量组	10.0	23.74±0.24	28.93±0.34 ¹⁾	31.04±0.90 ¹⁾	31.56±1.00 ¹⁾	27.35±0.85 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ 。

表 2 开心散对抑郁小鼠糖水偏好、强迫游泳和悬尾行为的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 2 Effect of Kaixin San on sucrose preference, forced swimming, and tail suspension in depressed mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	糖水偏好率/%	强迫游泳累计不动时间/s	悬尾累计不动时间/s
空白组		93.33±0.63	47.49±8.40	64.38±6.46
模型组		84.56±2.88 ²⁾	102.06±5.11 ²⁾	105.02±12.62 ¹⁾
氟西汀组	0.01	93.67±0.78 ⁴⁾	34.69±5.17 ⁴⁾	31.09±5.05 ⁴⁾
开心散低剂量组	2.5	89.54±1.76	84.36±13.30	39.16±8.08 ⁴⁾
开心散中剂量组	5.0	91.74±0.97 ³⁾	53.84±11.72 ⁴⁾	37.05±4.32 ⁴⁾
开心散高剂量组	10.0	92.53±0.82 ⁴⁾	44.35±9.71 ⁴⁾	49.38±8.13 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05, ^2)$ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05, ^4)$ $P<0.01$ (表 6-表 7 同)

表 3 开心散对抑郁小鼠旷场实验各指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Effect of Kaixin San on open field test in depressed mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	总路程/m	累计不动时间/s	中心区停留时间/s	角落区停留时间/s
空白组		42.41±1.81	324.38±26.39	47.64±4.02	304.55±6.48
模型组		38.81±1.08	340.10±8.25	46.47±6.05	303.17±9.73
氟西汀组	0.01	40.76±1.26	297.80±12.45	48.51±5.46	290.10±7.40
开心散低剂量组	2.5	40.04±1.16	305.97±10.34	47.75±2.52	310.46±10.48
开心散中剂量组	5.0	40.87±0.68	301.48±10.80	51.24±3.96	289.73±10.22
开心散高剂量组	10.0	41.77±1.28	339.17±30.83	54.98±5.39	278.48±10.33

3.3 粪便代谢组学分析

3.3.1 粪便代谢轮廓分析 在正离子模式下,共检测到16 216个代谢物;在负离子模式下检测到8 172个代谢物。对正负离子质谱数据进行合并,数据归一化处理,根据 $FC \geq 1.5$ 或 $FC \leq 0.67$, $P < 0.05$ 进行显著差异代谢物筛选。在正离子模式,与空白组比较,模型组共筛选出235个差异代谢物,其中130个代谢物上调,105个代谢物下调;与模型组比较,开心散组共筛选出605个差异代谢物,其中533个上调,72个下调。在负离子模式下,与空白组比较,模型组共筛选出3 777个差异代谢物,其中3 661个代谢物上调,116个代谢物下调;与模型组比较,开心散组筛选出1 550个差异代谢物,其中617个上调,933个下调。见增强出版附加材料。

3.3.2 粪便代谢物轮廓分析 PCA结果显示,正、负离子模式下各组样品的粪便代谢物谱存在差异。各组样本的分布通过95%置信区间表示,以反映组内代谢物的变异性。结果显示,模型组与空白组之间存在明显分离趋势,表明CRS处理明显改变了小鼠肠内代谢物状态。氟西汀组与开心散组相对于模型组位置变化,表明氟西汀和开心散对CRS诱导粪便代谢物紊乱具有明显改变效应。见增强出版

附加材料。

3.3.3 差异代谢物的筛选与鉴定 OPLS-DA对空白组、模型组及开心散组数据进行分析结果显示,在正、负离子模式下,组间均可明显区分,表明代谢物存在明显差异, R^2Y (模型对Y变量的解释率)和 Q^2 (模型的预测率)均 > 0.6 ,说明模型的解释率和预测能力良好。200次置换检验显示, Q^2 在Y轴上的截距为负值,表明模型未出现过拟合。分别在正、负离子模式下,选取满足 $FC \geq 1.5$ 或 $FC \leq 0.67$ 且 $P < 0.05$,同时在OPLS-DA模型中 $VIP > 1$ 的代谢物取其交集。交叉筛选出1 170个差异代谢物,其中,正离子模式下有304个,负离子模式下有866个。进行检验后的差异代谢物,再根据 FC (模型组/空白组) > 1 、 FC (给药组/模型组) < 1 , $FDR < 0.05$,筛选在模型组上调且在给药组下调的差异代谢物,或 FC (模型组/空白组) < 1 、 FC (给药组/模型组) > 1 , $FDR < 0.05$,筛选在模型组下调且在给药组上调的差异代谢物;然后将这些代谢物在人类代谢组数据库(HMDB)数据库中进行精确检索,结果显示组间共有7个关键差异代谢物,包括色氨酸代谢物、胆固醇代谢物和脂肪酸等。见增强出版附加材料及见表4。

表4 小鼠粪便差异代谢物分析

Table 4 Analysis of differential metabolites in mouse feces

代谢产物	类别	HMDB ID	FDR	FC(模型组/空白组)	FC(开心散组/模型组)	FC(氟西汀组/模型组)
N-甲基-1H-吡啶-3-丙酰胺	色胺	HMDB0032756	0.000	3.089 ↑	0.516 ↓	0.686 ↓
吡啶乙酸	吡啶乙酸	HMDB0000197	0.003	6.669 ↑	0.102 ↓	0.640 ↓
脱氧胆酸	脱氧胆酸	HMDB0000626	0.003	6.694 ↑	0.615 ↓	1.281 ↑
皮质酮	类固醇	HMDB0001547	0.000	5.525 ↑	0.065 ↓	0.121 ↓
16-羟基十六烷酸	脂肪酸	HMDB0006294	0.007	3.488 ↑	0.604 ↓	1.089 ↑
9,10-二羟基-12-十八碳烯酸	脂肪酸	HMDB0004704	0.000	2.660 ↑	0.515 ↓	0.641 ↓
12,13-二羟基-9-十八碳烯酸	脂肪酸	HMDB0004705	0.000	2.791 ↑	0.533 ↓	0.550 ↓

注:↓,下调,↑,上调

3.3.4 差异代谢物的通路富集分析 将鉴定所得差异代谢物导入MetaboAnalyst 5.0代谢组学分析平台进行代谢通路的富集分析,通过代谢组学通路关系数据库(RaMP, <https://rampdb.nih.gov/>)进行差异代谢物富集,共鉴定出前25个代谢途径,如亚油酸氧化代谢、亚油酸的十八烷形成、内源性甾醇、蛋白酪氨酸激酶6(PTK6)表达、叉头框蛋白O(FoxO)介导的氧化应激、代谢及神经元基因的转录、按底物类型排列的细胞色素P450(CYP)、CYP11B2缺陷导致皮质酮甲基氧化酶1(CMO-1)缺乏症、神经元

PAS结构域蛋白4(NPAS4)基因表达的调控、NPAS4基因转录的调控、Runt相关转录因子2(RUNX2)表达和活性的调控、细胞内受体的小泛素相关修饰物(SUMO)化修饰、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPARA)激活基因表达等。在MetaboAnalyst 5.0平台,应用KEGG数据库进行差异代谢物富集,鉴定出2条与小鼠抑郁相关代谢途径,分别是色氨酸代谢和类固醇激素生物合成。色氨酸代谢是粪便代谢组学KEGG富集到的首要通路,在色氨酸代谢途径中5-HT途径是与抑郁症经典单胺类神经学说

直接相关。5-HT作为肠脑共有信号分子,因此从肠脑轴5-HT系统改变进行验证。见增强出版附加材料。

3.4 开心散对抑郁小鼠血清、结肠、前额皮层5-HT含量的影响 结果显示,与空白组比较,模型组血清、结

肠、前额皮层5-HT水平均明显下调($P<0.05$);与模型组比较,氟西汀组和开心散中、高剂量血清5-HT有增高趋势,但差异无统计学意义,氟西汀组和开心散高剂量组结肠组织5-HT水平明显升高($P<0.05$),各给药组前额皮层5-HT水平均显著升高($P<0.01$)。见表5。

表5 开心散对抑郁小鼠血清、结肠、前额皮层5-HT含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Kaixin San on 5-HT content in serum, colon, and prefrontal cortex of depressed mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	5-HT/μg·L ⁻¹		
		血清	结肠	前额皮层
空白组		37.15±2.49	45.59±3.59	15.51±1.21
模型组		28.09±1.11 ¹⁾	28.76±3.25 ¹⁾	10.47±1.01 ¹⁾
氟西汀组	0.01	29.49±2.57	49.10±2.26 ²⁾	17.21±0.18 ³⁾
开心散低剂量组	2.5	26.60±1.52	38.66±3.36	18.60±0.97 ³⁾
开心散中剂量组	5.0	33.03±3.02	36.19±4.64	16.30±0.76 ³⁾
开心散高剂量组	10.0	31.06±1.86	47.05±2.73 ²⁾	17.89±1.32 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

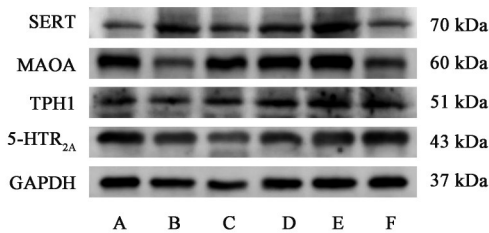
3.5 开心散对小鼠结肠组织TPH1、SERT、5-HTR₄、MAOA蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组TPH1、SERT、5-HTR₄、MAOA表达明显下调($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,氟西汀可

明显上调TPH1、SERT、MAOA表达($P<0.05, P<0.01$),开心散各剂量组明显上调TPH1、SERT表达差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表6、图1。

表6 开心散对小鼠结肠组织TPH1、SERT、5-HTR₄、MAOA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 6 Effect of Kaixin San on expression of TPH1, SERT, 5-HTR₄, and MAOA in mouse colon tissue ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TPH1/GAPDH	SERT/GAPDH	5-HTR ₄ /GAPDH	MAOA/GAPDH
空白组		1.06±0.02	1.00±0.07	1.10±0.10	1.06±0.06
模型组		0.86±0.03 ¹⁾	0.72±0.05 ²⁾	0.72±0.06 ²⁾	0.78±0.04 ¹⁾
氟西汀组	0.01	1.18±0.05 ⁴⁾	0.97±0.05 ³⁾	0.84±0.06	1.17±0.09 ⁴⁾
开心散低剂量组	2.5	1.08±0.03 ³⁾	0.94±0.03 ³⁾	0.83±0.04	1.04±0.06
开心散中剂量组	5.0	1.08±0.02 ³⁾	0.96±0.02 ³⁾	0.79±0.02	1.01±0.10
开心散高剂量组	10.0	1.12±0.07 ⁴⁾	0.96±0.04 ³⁾	0.81±0.03	0.93±0.02



注:A.空白组;B.模型组;C.氟西汀组;D.开心散低剂量组;E.开心散中剂量组;F.开心散高剂量组(图2同)

图1 各组小鼠结肠组织SERT、MAOA、TPH1、5-HTR₄蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoretic protein expression of SERT, MAOA, TPH1, and 5-HTR₄ in mouse colon tissue of each group

3.6 开心散对小鼠前额皮层组织TPH2、SERT、5-HTR_{2A}、MAOA蛋白表达的影响 与空白组比较,

模型组TPH2、MAOA表达明显下调($P<0.05$), SERT、5-HTR_{2A}表达显著上调($P<0.01$);与模型组比较,各给药组TPH2、MAOA的表达明显上调($P<0.05, P<0.01$), SERT、5-HTR_{2A}的表达明显下调($P<0.05, P<0.01$)。见表7、图2。

4 讨论

本研究在证实开心散水提取物抗抑郁活性基础上,进行了抗抑郁GABA机制研究。首先,采用粪便代谢组学分析发现了开心散抗抑郁关键代谢物和信号通路。在开心散水提取物灌胃给药后,肠道是药物发挥作用的第一道关口。虽然开心散水提取主要小分子化学成分已经鉴定^[15],但是开心散中茯苓和人参含有大量多糖成分,人参和远志中含有大

表7 开心散对小鼠前额皮层组织TPH2、SERT、5-HTR_{2A}、MAOA蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 7 Effect of Kaixin San on expression of TPH2, SERT, 5-HTR_{2A}, and MAOA in mouse prefrontal cortex tissue ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TPH2/GAPDH	SERT/GAPDH	5-HTR _{2A} /GAPDH	MAOA/GAPDH
空白组		1.14±0.03	0.95±0.06	0.94±0.04	1.04±0.06
模型组		0.96±0.06 ¹⁾	1.25±0.07 ²⁾	1.21±0.09 ²⁾	0.82±0.04 ¹⁾
氟西汀组	0.01	1.22±0.05 ⁴⁾	1.01±0.02 ³⁾	0.90±0.04 ⁴⁾	1.02±0.04 ³⁾
开心散低剂量组	2.5	1.22±0.03 ⁴⁾	1.01±0.04 ³⁾	0.97±0.05 ³⁾	1.05±0.03 ⁴⁾
开心散中剂量组	5.0	1.18±0.04 ⁴⁾	0.96±0.05 ⁴⁾	0.98±0.04 ³⁾	1.05±0.04 ⁴⁾
开心散高剂量组	10.0	1.18±0.02 ⁴⁾	0.93±0.04 ⁴⁾	0.98±0.04 ³⁾	1.07±0.04 ⁴⁾

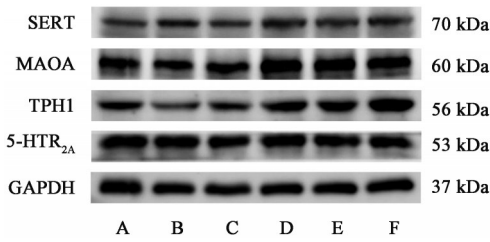


图2 各组小鼠前额皮层SERT、MAOA、TPH2、5-HTR_{2A}蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoretic protein expression of SERT, MAOA, TPH2, and 5-HTR_{2A} in mouse prefrontal cortex

量皂苷类成分,这些成分会与肠道菌群发生反应,如多糖发酵降解和皂苷类成分糖基水解等,从而改变肠道微生态,因此选择粪便代谢组学分析以考察粪便代谢物的变化。小鼠结肠粪便经UPLC-LTQ-Orbitrap MS检测代谢物改变,从代谢轮廓、差异代谢物和相关代谢通路角度分析,鉴定出多条主要代谢通路。虽然多条通路均与抗抑郁机制密切相关,本研究优先选择了色氨酸代谢通路,理由包括①色氨酸代谢通路在KEGG富集分析中位居第一,提示该通路发挥重要作用;②5-HT途径是色氨酸代谢重要方式^[19],色氨酸是5-HT唯一前体,两者关系密切;③脑5-HT系统紊乱是抑郁症发生和治疗的经典机制;④脑5-HT系统已有大量研究报道,而肠5-HT系统在抗抑郁中的作用有待考察。因此选择从肠、血清、前额皮层系统考察5-HT系统改变。需要指出的是,色氨酸代谢除5-HT途径外,还包括犬尿氨酸途径和吲哚途径,犬尿氨酸途径与神经炎症、氧化应激及抑郁发生密切相关^[20],吲哚途径在维持肠道屏障和调节免疫方面发挥重要作用^[21],后续研究将关注开心散对另外两条途径的调节作用。在差异代谢物中,吲哚乙酸(IAA)和脱氧胆酸(DCA)对5-HT系统发挥重要调节作用。IAA是肠道菌群代谢色氨酸产生的重要吲哚衍生物,DCA是肠道菌群代谢生成的次级胆汁酸,两者均能刺激肠道嗜铬细胞(EC)释放5-HT,这些5-HT能够刺激肠神经,进

而通过迷走神经调节脑功能^[22-23];外源性IAA能够显著增强脑和肠道中的5-HT通路活性^[24]。这些内容提示,粪便代谢组学蕴含丰富的生物学信息,有待进一步挖掘。

其次,本研究表明CRS显著改变了结肠、血清、前额皮层5-HT系统。模型组与空白组比较,在结肠部位,5-HT合成、含量、重摄取、受体和降解酶各环节均受到抑制,表明CRS导致肠道5-HT系统功能显著降低。血清5-HT主要来源于肠道合成,因此当肠道5-HT系统处于低水平时,血清5-HT相应随之下降。在前额皮层,模型组5-HT含量、TPH2、MAOA蛋白表达显著降低,表明5-HT合成和降解过程受到抑制;同时SERT、5-HTR_{2A}显著增高,SERT表达增高提示5-HT重摄取增强,提高5-HT再利用,5-HTR_{2A}表达增高提示突触后受体提高了敏感度,两者在5-HT含量显著下降情况下,做出了代偿性反应来维持突触功能。尽管结肠5-HT系统未观察到前额皮层这种代偿性反应,但是上述改变共同反映了CRS造模后结肠、血清、前额皮层5-HT系统整体变化状态,除5-HT系统改变外,在差异代谢物中,CRS显著增高了IAA、DCA、16-羟基棕榈酸、皮质酮等水平。此外文献报道CRS可诱导肠道菌群失调,如螺杆菌属增加、副拟杆菌属减少,激活海马核转录因子-κB(NF-κB)介导的神经炎症,并降低血浆中5-HT、DA、NE等单胺类递质水平^[25],由此证明慢性应激导致的是全身性反应,抑郁症的病理机制不限于神经和内分泌系统改变,而是属于全身性反应。

此外,本研究表明氟西汀和开心散可能通过改善肠和脑5-HT系统方式发挥抗抑郁作用。与模型组比较,选择性SERT抑制剂氟西汀治疗后,在结肠部位,TPH1、SERT、MAOA表达显著增高,5-HTR_{2A}有增高趋势,表明氟西汀显著改善肠道5-HT系统水平。虽然结肠5-HT含量显著增加,但是血清5-HT含量未显著增高。在前额皮层,5-HT含量显著增

加, TPH2、MAOA 蛋白表达显著上调, SERT、5-HTR_{2A} 表达显著下调, 提示氟西汀治疗后, 前额皮层 5-HT 系统显著改善。开心散治疗后, 与模型组比较, 在结肠部位, TPH1、SERT 显著增高, 5-HTR₄、MAOA 表达有增高趋势。结肠 5-HT 都有增高趋势, 但是只有高剂量组有显著性差异。血清 5-HT 随开心散剂量增高有增加趋势。在前额皮层, 开心散对 5-HT 系统的改变与氟西汀治疗一致, 由此提示开心散水提物与氟西汀在结肠、血清、前额皮层 5-HT 系统抗抑郁作用一致, 同时说明两者在抗抑郁作用中改变的不只是脑内 5-HT 系统, 还有肠 5-HT 系统。从差异代谢物看, 氟西汀和开心散治疗后均显著降低 CRS 诱导的 IAA 和 DCA 水平。此外, 文献报道氟西汀可调节肠道菌群, 增加乳酸杆菌比例, 经迷走神经上调海马 5-HT_{1A}、5-HT_{2C}、黑皮质素 4 受体 (MC4) 表达发挥抗抑郁作用^[26], 进一步支持了氟西汀和开心散同时作用于脑和肠部位。

最后, 研究证明开心散和氟西汀可能通过同步调节肠脑 5-HT 系统发挥抗抑郁作用。5-HT 是肠和脑共有信号分子, 虽然由于血脑屏障隔离, 外周和中枢 5-HT 是两个相对独立系统, 但是通过肠脑通讯途径两者紧密联系。肠道 EC 合成机体约 95% 的 5-HT, 在数量上占据着绝对优势, 肠道 5-HT 首先在局部发挥作用, 包括调节胃肠运动、分泌和内脏高敏感等^[27]; 同时肠道 5-HT 激活迷走神经传入纤维, 信号传递到大脑孤束核 (NTS), 调节中缝背核 (DRN) 5-HT 能神经元发挥抗抑郁作用^[28], 证明通过迷走神经可以直接关联肠和脑 5-HT 系统。在复杂的 GBA 通讯途径中, 肠和脑 5-HT 系统可能有更多相互作用方式有待揭示。本研究中, 无论开心散水提物还是氟西汀, 经灌胃给药后均首先调节肠道 5-HT 系统, 经肠道吸收后通过循环系统运送到脑组织, 部分成分透过血脑屏障后直接作用于脑 5-HT 系统。在此过程中, 氟西汀直接作用于肠和脑 5-HT 系统, 在开心散众多成分中, 有些成分经肠道吸收后能够入脑, 直接作用于肠和脑 5-HT 系统, 如挥发油、 β -细辛醚等; 有些成分虽然能够吸收入血但无法透过血脑屏障, 可能通过间接途径发挥作用, 如人参皂苷和远志皂苷类成分的中间代谢物, 如通过调节免疫细胞释放细胞因子发挥作用, 甚至有些成分不能直接吸收, 如茯苓多糖和人参多糖, 将在肠道内发酵降解, 通过肠道微生物群代谢物等方式, 发挥远程调节作用。本研究结果表明, 在开心散和氟西汀抗抑郁作用中, 肠和脑 5-HT 系统发生了同步改

变, 证明氟西汀和开心散通过肠脑同调模式发挥抗抑郁作用, 拓展了抗抑郁作用认知模式。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. Depression and other common mental disorders [EB/OL]. (2017-02-23) [2026-03-27]. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>.
- [2] HUANG Y, WANG Y, WANG H, et al. Prevalence of mental disorders in China: A cross-sectional epidemiological study [J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6(3): 211-224.
- [3] CHANG L, WEI Y, HASHIMOTO K. Brain-gut-microbiota axis in depression: A historical overview and future directions [J]. *Brain Res Bull*, 2022, 182: 44-56.
- [4] CRYAN J F, O'RIORDAN K J, COWAN C S M, et al. The microbiota-gut-brain axis [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(4): 1877-2013.
- [5] LIU X, LIU H, WEI F, et al. Fecal metabolomics and network pharmacology reveal the correlations between constipation and depression [J]. *J Proteome Res*, 2021, 20(10): 4771-4786.
- [6] BO M, ZHANG H, XU J, et al. Systematic review of Kaixinsan in treating depression: Efficacy and pharmacological mechanisms [J]. *Front Behav Neurosci*, 2022, 16: 1061877.
- [7] WANG YT, WANG X L, LEI L, et al. Efficacy of Chinese herbal formula Kai-Xin-San on rodent models of depression: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 321: 117492.
- [8] DANG H, SUN L, LIU X, et al. Preventive action of Kai Xin San aqueous extract on depressive-like symptoms and cognition deficit induced by chronic mild stress [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009, 234(7): 785-793.
- [9] DONG X Z, LI Z L, ZHENG X L, et al. A representative prescription for emotional disease, Ding-Zhi-Xiao-Wan restores 5-HT system deficit through interfering the synthesis and transshipment in chronic mild stress-induced depressive rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(3): 1053-1061.
- [10] ZHU K Y, MAO Q Q, IP S P, et al. A standardized Chinese herbal decoction, Kai-Xin-San, restores decreased levels of neurotransmitters and neurotrophic factors in the brain of chronic stress-induced depressive rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 149256.
- [11] LU S H, GUO J, CAI C, et al. Effects of Kaixin powder on expression of 5-HT receptor in hippocampus of depressed rats induced by CUMS [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(2): 150-154.
- [12] CAO C, LIU M, QU S, et al. Chinese medicine formula Kai-Xin-San ameliorates depression-like behaviours in chronic unpredictable mild stressed mice by regulating gut microbiota-inflammation-stress system [J]. *J*

- Ethnopharmacol, 2020, 261: 113055.
- [13] 李鑫, 李璇, 黄小宁, 等. 开心散联合氟西汀改善抑郁模型小鼠肠道吸收功能损伤的效用评价研究[J]. 南京中医药大学学报, 2025, 41(3): 313-322.
- LI X, LI X, HUANG X N, et al. Evaluation of the efficacy of Kai-Xin-San combined with fluoxetine in improving intestinal absorption damage in depression model mice [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2025, 41(3): 313-322.
- [14] 曹程. 基于脑-肠轴调控的开心散抗抑郁功效物质基础研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- CAO C. Study of anti-depressive material basis of Kai-Xin-San on regulation of brain-gut axis [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2019.
- [15] 白云凤, 黄智兴, 唐雅楠, 等. 基于UHPLC Q-Exactive Orbitrap MS/MS和分子网络技术快速鉴定开心散化学成分[J]. 中国现代中药, 2025, 27(2): 258-273.
- BAI Y F, HUANG Z X, TANG Y N, et al. Rapid identification of chemical components in KaixinSan by UHPLC Q-Exactive Orbitrap MS/MS and molecular network analysis [J]. Mod Chin Med, 2025, 27(2): 258-273.
- [16] 张林, 曾凤. 《千金要方》开心散剂量的文献考证[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(8): 641-644.
- ZHANG L, ZENG F. Textual research on the dosage of Kai Xin San in Qian Jin Yao Fang [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2020, 43(8): 641-644.
- [17] GUO J, HAN P, ZHENG Y, et al. Study on plasma metabolomics profiling of depression in Chinese community-dwelling older adults based on untargeted LC/GC-MS [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 10303.
- [18] MENG Y, CHENG M, QU H, et al. Targeted plasma metabolomics reveals potential biomarkers of the elderly with mild cognitive impairment in Qingdao rural area [J]. Front Aging Neurosci, 2024, 16: 1511437.
- [19] XUE C, LI G, ZHENG Q, et al. Tryptophan metabolism in health and disease [J]. Cell Metab, 2023, 35(8): 1304-1326.
- [20] PEARSON K, BEIER K, MARDIS T, et al. The neurochemistry of depression: The good, the bad and the ugly [J]. Mo Med, 2024, 121(1): 68-75.
- [21] YE X, LI H, ANJUM K, et al. Dual role of indoles derived from intestinal microbiota on human health [J]. Front Immunol, 2022, 13: 903526.
- [22] HAN J, ZHANG L, LYU Y, et al. Indole-3-acetic acid exerts protective effects on sleep deprivation-induced cognitive impairment [J]. Neuropharmacology, 2026, 283: 110747.
- [23] XIE X, LI W, XIONG Z, et al. Metformin reprograms tryptophan metabolism via gut microbiome-derived bile acid metabolites to ameliorate depression-like behaviors in mice [J]. Brain Behav Immun, 2025, 123: 442-455.
- [24] CHEN Y, TIAN P, WANG Z, et al. Indole acetic acid exerts anti-depressive effects on an animal model of chronic mild stress [J]. Nutrients, 2022, 14(23): 5019.
- [25] YANG H L, LI M M, ZHOU M F, et al. Links between gut dysbiosis and neurotransmitter disturbance in chronic restraint stress-induced depressive behaviours: The role of inflammation [J]. Inflammation, 2021, 44(6): 2448-2462.
- [26] LEE Y B, CHO Y J, KIM J K. The unique role of fluoxetine in alleviating depression and anxiety by regulating gut microbiota and the expression of vagus nerve-mediated serotonin and melanocortin-4 receptors [J]. Biomed Pharmacother, 2025, 182: 117748.
- [27] BELLONO N W, BAYRER J R, LEITCH D B, et al. Enterochromaffin cells are gut chemosensors that couple to sensory neural pathways [J]. Cell, 2017, 170(1): 185-198.
- [28] HWANG Y K, OH J S. Interaction of the vagus nerve and serotonin in the gut-brain axis [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(3): 1160.

[责任编辑 王鑫]