

# 银杏蜜环口服溶液对孤养结合慢性不可预知温和应激大鼠 抑郁模型P2RX7/NLRP3信号通路的影响

曹姗<sup>1,2</sup>, 范晓迪<sup>1</sup>, 赵步长<sup>3</sup>, 徐立<sup>1</sup>, 王益民<sup>3</sup>, 宋文婷<sup>1</sup>, 王勇<sup>3</sup>, 姚明江<sup>1</sup>,  
顾国强<sup>3</sup>, 赫长清<sup>3</sup>, 王光蕊<sup>1</sup>, 刘建勋<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091;  
2. 云南中医药大学, 昆明 650500; 3. 步长制药, 西安 710082)

**[摘要]** 目的:通过观察银杏蜜环口服溶液对抑郁模型大鼠的影响,探讨银杏蜜环口服溶液抗抑郁的机制。方法:50只SD大鼠,除正常组外,采用孤养结合慢性不可预见性应激(CUMS)大鼠抑郁模型,模型成功的大鼠分为模型组,氟西汀组(10 mg·kg<sup>-1</sup>),银杏蜜环口服溶液高、低剂量组(618,309 mg·kg<sup>-1</sup>),每组10只;连续造模21 d,刺激第7天给药,以10 mL·kg<sup>-1</sup>体积连续给药14 d,正常组与模型组灌胃蒸馏水;进行糖水偏好实验、旷场实验、悬尾不动实验;苏木素-伊红(HE)染色法观察抑郁大鼠海马组织病理形态变化;运用多因子检测技术(Luminex)及蛋白免疫印迹法(Western blot)技术检测各组大鼠海马组织白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的含量及NOD样受体3(NLRP3)及其相关激活信号通路蛋白的表达水平。结果:连续给药14 d后,与正常组比较,模型组大鼠糖水消耗率明显降低、直立次数明显减少、悬尾不动累积时间明显延长( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,氟西汀及银杏蜜环口服溶液高剂量组大鼠表现为直立、穿格次数增加,糖水消耗率增加,悬尾不动累积时间明显缩短( $P<0.05, P<0.01$ )。HE结果显示,银杏蜜环口服溶液高剂量组大鼠海马区神经元细胞排列有序,轻度疏松,小胶质细胞浸润不明显;与正常组比较,模型组海马组织中IL-1 $\beta$ , IL-6和TNF- $\alpha$ 的含量明显增加( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,银杏蜜环口服溶液高剂量组大鼠脑组织IL-1 $\beta$ , IL-6和TNF- $\alpha$ 的含量明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。分子生物学实验表明,与正常组比较,模型组嘌呤能受体P2X7(P2RX7), NLRP3, 凋亡相关斑点样蛋白(ASC), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1), IL-1 $\beta$ 蛋白表达明显增加( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,氟西汀及银杏蜜环口服溶液高剂量组可明显抑制P2RX7, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$ 蛋白表达( $P<0.05, P<0.01$ )。结论:银杏蜜环口服溶液可以改善孤养结合CUMS诱导的大鼠抑郁样行为,其作用机制与调控P2RX7/NLRP3信号通路相关。

**[关键词]** 银杏蜜环口服溶液; 抑郁症; NOD样受体3(NLRP3); 嘌呤能受体P2X7(P2RX7)

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)12-0033-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211103

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210407.1718.006.html>

**[网络出版日期]** 2021-4-8 9:46

## Effect of Yinxing Mihuan Oral Solution on P2RX7/NLRP3 Signaling Pathway in Depression Model Rats Induced by Isolation Combined with Chronic Unpredictable Mild Stress

CAO Shan<sup>1,2</sup>, FAN Xiao-di<sup>1</sup>, ZHAO Bu-chang<sup>3</sup>, XU Li<sup>1</sup>, WANG Yi-min<sup>3</sup>, SONG Wen-ting<sup>1</sup>,  
WANG Yong<sup>3</sup>, YAO Ming-jiang<sup>1</sup>, GU Guo-qiang<sup>3</sup>, HE Chang-qing<sup>3</sup>, WANG Guang-rui<sup>1</sup>, LIU Jian-xun<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

2. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

3. Buchang Pharma, Xi'an 710082, China)

**[收稿日期]** 20210122(012)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09737-009);北京市科技计划“十病十药”研发项目(Z171100001717004)

**[第一作者]** 曹姗,在读硕士,从事脑血管药理学研究,Tel:010-62835608,E-mail:2105798532@qq.com

**[通信作者]** \*刘建勋,博士,研究员,从事心脑血管药理学和新药研究,Tel:010-62835601,E-mail:liujx0324@sina.com

**[Abstract]** **Objective:** To explore the antidepressant mechanism of Yinxing Mihuan oral solution (YMO) by investigating its effect on depression model rats. **Method:** The depression rats were induced by isolation combined with chronic unpredictable mild stress (CUMS) and then randomly divided into model group, fluoxetine group ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and high-dose ( $618 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and low-dose ( $309 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) YMO groups. A blank control group was also set up and ten rats were included in each group. Modeling lasted for 21 consecutive days, and rats were administered the 8th day after stimulation at a dose of  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  for 14 days, except those in the blank control and model groups which were given distilled water. Afterward, the sucrose preference test, open field test, tail suspension test were carried out. The pathological changes of hippocampus in depression rats were observed after hematoxylin-eosin (HE) staining. The content of interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the hippocampus of rats in each group and the expression of NOD-like receptor 3 (NLRP3) and other proteins in its related activation signaling pathways were detected with multi-factor detection (Luminex) and Western blot. **Result:** After 14 days of continuous administration, compared with the blank control group, the model group witnessed significantly reduced sugar water consumption rate and the times of rearing and significantly prolonged cumulative time of immobility during tail suspension ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the fluoxetine group and the high-dose YMO group saw increases in the times of rearing, times of crossing and sugar water consumption rate and a significant decrease in the cumulative time of immobility during tail suspension ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The results of HE staining showed that the neurons in the hippocampus of rats in the high-dose YMO group were arranged in order and slightly loosened, without obvious microglia infiltration observed. The levels of IL- $1\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the hippocampus of the model group increased significantly as compared with the blank control group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and their content in the high-dose YMO group was significantly lowered in the comparison with the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Molecular biology experiments demonstrated that compared with the results of blank group, the expression of purinergic receptor P2X7 (P2RX7), NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein (ASC), Caspase-1 and IL- $1\beta$  remarkably increased in the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Additionally, the expression of P2RX7, NLRP3, ASC, Caspase-1 and IL- $1\beta$  was significantly inhibited in the fluoxetine group and the high-dose YMO group compared with the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** YMO can improve the depression-like behaviors of rats induced by isolation combined with CUMS, and its mechanism of action is related to the regulation of the P2RX7/NLRP3 signaling pathway.

**[Key words]** Yinxing Mihuan oral solution; depression; NOD-like receptor 3 (NLRP3); purinergic receptor P2X7 (P2RX7)

抑郁症以情绪低落、活动减少及思维迟缓等3大症状为核心特征,是导致精神残疾的第4大病因。世界卫生组织预测抑郁症将会在2020年左右成为继高血压之后的第2大临床慢性疾病<sup>[1]</sup>。抑郁症发病机制复杂,近几十年来神经炎症学说在抑郁症的发生发展机制中受到越来越多的关注。目前,已知与抑郁症发病相关的细胞因子包括白细胞介素(IL)- $1\beta$ , IL-6, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )的研究较多,作用也较为明确<sup>[2]</sup>。炎症小体是机体固有免疫的重要组成部分,目前在已知的4种炎症小体中,NOD样受体3(NLRP3)炎症小体活化的刺激物种类最为广泛。ZHANG等<sup>[3]</sup>研究证明NLRP3炎症小体参与抑郁症的发病过程,同时发现NLRP3炎症小

体抑制剂可阻断抑郁行为。既往研究均表明NLRP3炎症小体可以通过调节IL- $1\beta$ 的表达参与应激诱导的抑郁样行为发生,NLRP3炎症小体通路在抑郁症的发病机制中扮演着重要角色,可能成为抑郁症新的防治靶点<sup>[4-5]</sup>。

银杏蜜环口服溶液是由银杏叶和蜜环菌组合而成的上市药物,临床用于缺血性心脑血管疾病,本实验室前期研究发现,银杏蜜环口服溶液能明显改善多发性脑梗死大鼠神经功能,显著降低脑内谷氨酸(Glu), $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)及血清TNF- $\alpha$ 水平<sup>[6]</sup>。体外实验表明银杏蜜环口服溶液高、中、低3个剂量组均可抑制上清液TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ 和IL-6含量,其中对IL- $1\beta$ 和IL-6的作用明显优于银杏叶提

取物和天麻蜜环菌<sup>[7]</sup>。本研究通过孤养复合慢性不可预知温和应激(CUMS)刺激建立应激抑郁模型,观察银杏蜜环口服溶液治疗后大鼠行为学的改变及NLRP3信号通路相关蛋白在海马中的表达变化,探讨NLRP3信号通路在银杏蜜环口服溶液治疗抑郁症中的作用。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级健康成年的SD大鼠,雄性,体质量200~220 g,由北京斯贝福生物技术有限公司提供,许可证号SYXK(京)2015-0011,合格证号SCXK(京)2016-0002。动物购进后适应性喂养3 d,自由摄食饮水,12 h/12 h昼夜循环,室温(22±2) °C,相对湿度为50%~60%。本实验均符合北京实验动物福利伦理审查指南的相关要求。

**1.2 药物、试剂** 银杏蜜环口服溶液(邛崃天银制药有限公司,10 mL/支,批号171133);盐酸氟西汀分散片(简称氟西汀,法国Patheon France公司,礼来苏州制药有限公司分包装,批号7336A);Minute™总蛋白提取试剂盒(美国Invent Biotechnologies公司,批号Inc.SD-001);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,货号G1120);无水乙醇、二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,货号分别为10009218,10023418);蛋白浓度测定试剂盒(美国Bio-Rad公司,批号500-0205);山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国CST公司,批号7074P2);嘌呤能受体P2X7(P2RX7),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1),凋亡相关斑点样蛋白(ASC), $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国Bioss公司,批号分别为bs-12106R,bs-0169R,bs-6741R,bs-0061R);NLRP3抗体(万类嵘荣生物科技武汉有限责任公司,批号WL02635);IL-1 $\beta$ (美国Proteintech公司,批号16806-1-AP);RnD-Luminex多因子检测试剂盒(上海优宁维生物科技股份有限公司,批号LXSARM-06,X-200)。

**1.3 仪器** Olympus BX51型显微镜(日本奥林帕斯公司);SYNERGY™ 4型多功能酶标仪(美国BioTek公司);Mini Trans-Blot Transfer Cell型转移电泳槽,Mini PROTEAN3 Cell型垂直板电泳槽,Chem Doc™ XRS+型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);Luminex 200型液相悬浮芯片系统(美国Luminex公司)。

## 2 方法

**2.1 造模与分组** 动物饲养2 d,根据体质量随机分组。除正常组,每只动物单笼饲养。慢性不可预

见性刺激实验造模方法在Willner方法的基础上加以修改<sup>[8]</sup>,除正常组大鼠外,连续刺激3周,①昼夜颠倒,白天在无对外窗户的饲养室关灯12 h,夜晚开灯12 h;②冰水游泳5 min,放置冰块的水桶,水温约(4±1) °C;③夹尾实验1 min,长尾夹夹住大鼠尾尖1 cm位置;④摇晃15 min,将大鼠固定在摇床上匀速摇晃;⑤禁食禁水24 h;⑥热刺激5 min(鼠笼放置45 °C烘箱中15 min);⑦50 V交流电电击足底20次,10 s/次。所有刺激随机安排。实验分为正常组,模型组,氟西汀组(10 mg·kg<sup>-1</sup>),银杏蜜环口服溶液高剂量组(618 mg·kg<sup>-1</sup>)和银杏蜜环口服溶液低剂量组(309 mg·kg<sup>-1</sup>)。给药剂量依据实验室前期实验基础进行设定<sup>[6,9]</sup>。正常组与模型组按10 mL·kg<sup>-1</sup>灌胃蒸馏水,其余各给药组分别按10 mL·kg<sup>-1</sup>灌胃,刺激7 d后给药,连续给药14 d。

**2.2 行为学实验** 对大鼠刺激3个周期,共21 d,刺激第8天开始给药,连续给药14 d,于刺激的第15天开始测定行为学。

**2.2.1 糖水偏好实验(SPF)** 实验开始前1 d训练所有大鼠适应含1%蔗糖水,每笼同时给予2瓶均装有1%蔗糖水100 mL糖水,禁水24 h。检测时给予每只大鼠100 mL 1%蔗糖水和纯水各1瓶,1 h后测量大鼠的糖水消耗与纯水消耗量,计算糖水消耗率=糖水消耗量/总液体消耗量×100%。

**2.2.2 旷场实验(OFT)** 实验过程中确保室内隔音且保持安静状态。实验时将大鼠迅速放于实验箱底部的中央方格内,然后记录每只大鼠的水平运动得分和垂直运动得分。以大鼠水平穿越1格(以大鼠三肢以上穿越底面方格为标准)计为水平运动评分1分;以双前肢离开箱底面的直立次数为垂直运动得分评分1分。每只大鼠接受1次测试,每次时间为3 min。每次测试前用75%乙醇彻底清除箱内残留气味。

**2.2.3 悬尾实验(TST)** 采用自制悬尾杆,在大鼠尾部距尾尖3 cm处用软夹、胶布固定于杆上,大鼠头部距离地面大于50 cm。实验时悬挂5 min,记录累计静止时间。

**2.3 HE染色观察大鼠海马组织病理学变化** 二甲苯I,II浸泡各15 min脱蜡;无水乙醇I,II浸泡5 min;梯度乙醇冲洗水化;苏木素染色5 min,水洗;伊红染色5 min;梯度乙醇冲洗;二甲苯I,II浸泡各5 min;中性树脂胶封片,光镜下观察。

**2.4 Luminex多因子检测** 根据Minute™总蛋白提取试剂盒说明将加入细胞裂解液的海马组织进行

研磨,室温孵育1~2 min后,14 000 r·min<sup>-1</sup>离心(离心半径84 mm)2 min取上清。对照品按照COA提供的稀释方式稀释,稀释液为RD6-52作为标准曲线最高浓度,依次做3倍稀释。重悬beads后,向每孔加入50 μL的已稀释的beads,分别对应加入50 μL的对照品和样本,按照比例依次加入生物素标记的检测抗体复合物及PE-链霉亲和素试剂,分别进行摇床,放置磁力架,清洗,最后上机检测。实验由上海优宁维生物科技股份有限公司LabEx多因子组负责检测。

### 2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织P2RX7, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1β蛋白表达

根据Minute™总蛋白提取试剂盒说明提取海马组织蛋白,将2 g·L<sup>-1</sup>的BSA对照品原液稀释成100 mg·L<sup>-1</sup>的对照品Stock solution,样品进行300倍稀释后振荡混匀。配好的对照品、样品各40 μL依次加入96孔板,再加入160 μL DyeReagent,室温避光反应15 min。酶标仪595 nm波长处检测吸光度A。配制10%或12.5%分离胶,将提取的大鼠海马组织蛋白样品按每孔含量20 μg进行上样。蛋白经电泳及转膜结束后,放置摇床上室温封闭1 h。封闭后放置一抗(1:1 000)中,4 °C孵育过夜。次日TBST洗膜5次,每次6 min。5% BSA封闭液再次封闭30 min,按1:2万加入抗兔二抗,室温孵育1 h后, TBST洗膜5次,每次6 min,化学发光和凝胶成像仪中显影。蛋白条带用Image Lab软件自动分析。

### 2.6 统计学方法

数据统计分析用SPSS 16.0软件进行统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组实验数据通过方差齐性检验后,多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 对抑郁模型大鼠行为学运动的影响

与正常组比较,模型组大鼠糖水消耗率明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,给药组大鼠糖水消耗率均有增加,其中氟西汀组、银杏蜜环口服溶液高剂量组大鼠糖水消耗率显著增加( $P < 0.01$ )。见表1。与正常组比较,模型组大鼠直立次数明显减少( $P < 0.05$ );与模型组比较,氟西汀组、银杏蜜环口服溶液高剂量组大鼠直立次数明显增加( $P < 0.05$ )。与正常组比较,模型组大鼠穿格次数显著减少( $P < 0.01$ );与模型组比较,给药组大鼠穿格次数均明显增加( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表2。与正常组比较,模型组大鼠悬尾不动累积时间显著延长( $P < 0.01$ );与模型组比较,给药组大鼠悬尾不动累积时间均明显缩短( $P < 0.05$ )。见表3。

表1 银杏蜜环口服溶液对大鼠糖水消耗的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of Yinxing Mihuan oral solution (YMO) on consumption of sugar and water in rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	糖水消耗率/%
正常		54.22±2.99
模型		43.70±1.42 <sup>1)</sup>
氟西汀	10	59.31±2.71 <sup>4)</sup>
银杏蜜环口服溶液	618	57.60±4.05 <sup>4)</sup>
	309	51.39±3.98

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表2~5同)。

表2 银杏蜜环口服溶液对大鼠旷场活动的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of YMO on open field activities in rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	直立次数	穿格次数
正常		11.90±0.85	95.60±10.81
模型		7.30±1.11 <sup>1)</sup>	47.20±9.79 <sup>2)</sup>
氟西汀	10	11.70±1.51 <sup>3)</sup>	90.60±15.44 <sup>3)</sup>
银杏蜜环口服溶液	618	11.30±1.45 <sup>3)</sup>	95.40±14.86 <sup>4)</sup>
	309	10.70±1.12	84.20±11.78 <sup>3)</sup>

表3 银杏蜜环口服溶液对大鼠悬尾不动累积时间的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of YMO on accumulated time of tail suspended immobility in rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

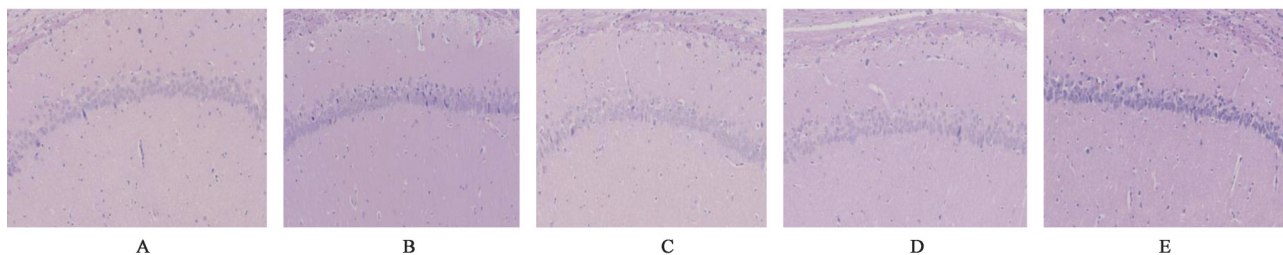
组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	静止不动时间/s
正常		69.80±11.83
模型		114.70±10.98 <sup>2)</sup>
氟西汀	10	74.50±5.58 <sup>3)</sup>
银杏蜜环口服溶液	618	77.70±9.41 <sup>3)</sup>
	309	81.10±9.94 <sup>3)</sup>

### 3.2 对抑郁模型大鼠海马组织病理学结构的影响

正常组神经细胞层数4~5层,细胞排列紧密,层次清楚,染色质细颗粒状,核仁清晰,间质内极少量小胶质细胞浸润。模型组局部神经细胞层数减少至2~3层,疏松,排列紊乱,局部细胞变性,核固缩,间质小胶质细胞增生。氟西汀组、银杏蜜环口服溶液低剂量组神经细胞层数3~4层,排列较为有序,疏松,细胞轻度变性,少量小胶质细胞浸润。高剂量组神经细胞层数3~4层,排列有序,轻度疏松,散在细胞轻度变性,小胶质细胞浸润不明显。见图1。

### 3.3 对抑郁模型大鼠海马组织IL-1β, IL-6, TNF-α的影响

与正常组比较,模型组大鼠海马组织IL-1β, IL-6, TNF-α含量明显增加( $P < 0.05, P < 0.01$ );与



A. 正常组; B. 模型组; C. 氟西汀组; D. 银杏蜜环口服溶液高剂量组; E. 银杏蜜环口服溶液低剂量组(图2同)

图1 银杏蜜环口服溶液对大鼠海马病理形态学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of YMO on pathomorphology of hippocampus in rats (HE, ×200)

模型组比较, 银杏蜜环口服溶液高剂量组大鼠海马组织 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  含量明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 氟西汀组大鼠海马组织 IL-6, TNF- $\alpha$  含量明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表4。

表4 银杏蜜环口服溶液对大鼠脑组织炎症因子含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of YMO on inflammatory factors in brain tissue of rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
正常		5.45±0.40	24.56±1.18	21.26±0.47
模型		6.67±0.26 <sup>1)</sup>	32.75±1.37 <sup>2)</sup>	24.45±0.60 <sup>3)</sup>
氟西汀	10	7.26±0.55	28.32±1.03 <sup>3)</sup>	21.58±0.64 <sup>4)</sup>
银杏蜜环口服溶液	618	5.59±0.22 <sup>3)</sup>	26.08±1.09 <sup>4)</sup>	21.99±0.61 <sup>4)</sup>
	309	6.61±0.45	35.16±1.38	24.01±0.57

3.4 对抑郁模型大鼠海马组织 P2RX7, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$  蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠海马组织 P2RX7, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$  蛋白表达明显增加 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 银杏蜜环口服溶液高、低剂量

组大鼠海马组织 P2RX7 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), 氟西汀组、银杏蜜环口服溶液高剂量组 NLRP3, ASC 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), 氟西汀组、银杏蜜环口服溶液高、低剂量组大鼠 Caspase-1, IL-1 $\beta$  蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表5, 图2。

表5 银杏蜜环口服溶液对大鼠 P2RX7, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$  的蛋白表达影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 5 Effect of YMO on protein expression of P2RX7, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$  in rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	P2RX7/ $\beta$ -actin	NLRP3/ $\beta$ -actin	ASC/ $\beta$ -actin	Caspase-1/ $\beta$ -actin	IL-1 $\beta$ / $\beta$ -actin
正常		0.16±0.04	0.27±0.03	0.11±0.04	0.07±0.01	0.24±0.02
模型		0.34±0.08 <sup>1)</sup>	0.45±0.04 <sup>1)</sup>	0.30±0.06 <sup>1)</sup>	0.19±0.01 <sup>2)</sup>	0.38±0.03 <sup>1)</sup>
氟西汀	10	0.27±0.05	0.24±0.03 <sup>3)</sup>	0.11±0.02 <sup>3)</sup>	0.08±0.01 <sup>4)</sup>	0.22±0.02 <sup>4)</sup>
银杏蜜环口服溶液	618	0.09±0.02 <sup>4)</sup>	0.25±0.02 <sup>3)</sup>	0.08±0.05 <sup>3)</sup>	0.07±0.01 <sup>4)</sup>	0.11±0.04 <sup>4)</sup>
	309	0.14±0.03 <sup>3)</sup>	0.42±0.06	0.12±0.05	0.09±0.02 <sup>4)</sup>	0.20±0.07 <sup>4)</sup>

#### 4 讨论

抑郁症是一种精神情感障碍性疾病, 主要表现为持续的心境低落和情绪障碍, 与神经递质表达异常、炎症因子分泌、神经细胞通路改变、下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)持续紊乱以及线粒体结构异常等诸多因素有关, 严重危害人类健康<sup>[10]</sup>。抑郁症致病机制复杂, 临床研究存在多种假说, 其中神经炎症假说一直是研究热点。越来越多临床及动物模型研究证实了慢性应激可诱导激活炎症细胞, 使其释放大量炎症细胞因子。国内外相关研究发现多种细胞因子参与抑郁症的发生, 其中 IL-1 $\beta$ , IL-6,

TNF- $\alpha$  等在抑郁症的发病机制中扮演着重要角色。临床研究表明抑郁症患者脑脊液及外周血液中相关促炎性因子表达升高, 抑郁症患者在治疗前, 促炎性因子 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 在血清的浓度高于正常对照组<sup>[11]</sup>。同时, BUFALINO 等<sup>[12]</sup>研究证明在自杀死亡的抑郁症患者大脑样本中发现大量的内源性免疫因子, 如 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR3 及 TLR4 等。

NLRP3 炎症小体的活化是炎症反应影响抑郁症发病的重要机制之一。它由胞内固有免疫受体 Caspase-1 和 ASC 组成的蛋白质复合体, 位于巨噬细胞和小胶质细胞中, 负责识别广泛的危险信号<sup>[13]</sup>。

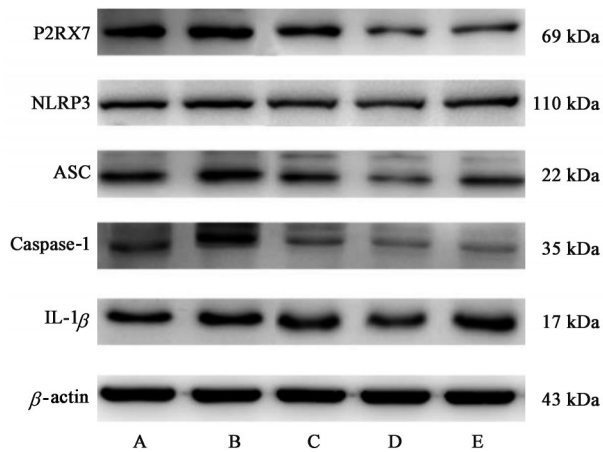


图2 各组大鼠P2RX7, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$ 的蛋白表达电泳态

Fig. 2 Electrophoresis state of protein expression of P2RX7, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$  in each group of rats

NLRP3的C端亮氨酸重复序列(LRR)识别微生物及内源性危险信号,促使NLR寡聚化并形成炎性小体的核心结构,NLR的N端的热蛋白结构域(PYD)与ASC的PYD相互作用,通过CARD结构域招募pro-Caspase-1,2个pro-Caspase-1相互寡聚化并自身酶解生成半胱天冬酶Caspase-1<sup>[14-15]</sup>。Caspase-1又称IL-1 $\beta$ 转化酶(ICE)将无活性的促炎细胞因子pro-IL-1 $\beta$ 和pro-IL-18剪切成为成熟的IL-1 $\beta$ 和IL-18。P2RX7是腺苷三磷酸门控阳离子通道受体,作为嘌呤受体P2X家族受体亚型之一,主要由各种免疫细胞表达,巨噬细胞和小胶质细胞是其主要的表达场所,并参与抑郁症的发生发展过程。P2RX7位于NLRP3的上游,可通过NLRP3促进炎症细胞因子IL-1 $\beta$ 等的释放<sup>[16]</sup>。海马中含有大量的免疫细胞,研究证明,当给予CUMS应激刺激后,可通过激活膜受体P2RX7,促进NLRP3炎症信号通路激活,导致IL-1 $\beta$ 的释放进而诱导抑郁的发生<sup>[17-18]</sup>。YUE等<sup>[19]</sup>的研究也指出导致动物出现抑郁样行为与海马小胶质细胞中的P2X7受体及其下游的NLRP3炎性小体活性水平提高密切相关。

银杏叶是为银杏科植物银杏的干燥叶,主要活性成分为萜类内酯和银杏黄酮,现代药理研究表明银杏叶提取物及其制剂具有神经保护作用,可提高抑郁症患者的认知功能。文献证明银杏酮酯GBE50对大鼠抑郁样行为的改善与抑制炎症细胞因子作用相关<sup>[20]</sup>。刘富群等<sup>[21]</sup>对GBE50的研究表明其改善大鼠的抑郁样行为可能与其降低NLRP3炎症小体蛋白表达及促炎性因子分泌有关。

CUMS模型是公认的研究抑郁症的动物模型

之一<sup>[22]</sup>。随着研究的深入,一些研究也表明长期与社会隔离会造成类似于焦虑和抑郁的症状,应当将这一因素考虑进去。姚立华等<sup>[23]</sup>的研究中指出孤养结合CUMS抑郁模型具有高度的有效性,较单纯CUMS模型可持续较长时间,模型更为稳定。可应用于抑郁症发病机制和抗抑郁药物作用机制的研究<sup>[24-25]</sup>,并在相关药物的研究中得到证实<sup>[26-27]</sup>。SU等<sup>[28]</sup>发现NLRP3基因敲除后,经典的慢性轻度不可预测性刺激不能成功复制出抑郁动物模型,且在外周血中IL-1 $\beta$ 水平无升高。因此本实验采用孤养结合CUMS大鼠抑郁模型,构建大鼠应激诱导的慢性抑郁症模型。糖水偏好实验、旷场实验、悬尾实验及水迷宫实验是检测大鼠是否出现抑郁样行为的重要指标。实验结果显示,与模型组大鼠比较,银杏蜜环口服溶液高剂量组大鼠抑郁样行为明显改善。病理形态观察大鼠海马组织显示氟西汀组、银杏蜜环口服溶液高、低剂量组神经元结构及小胶质细胞增生均有改善,其中银杏蜜环口服溶液高剂量组小胶质细胞浸润的改善更加明显。表明银杏蜜环口服溶液对抑郁模型大鼠具有明显的脑保护作用。进一步观察银杏蜜环口服溶液对细胞因子的作用,结果表明,与模型组比较,银杏蜜环口服溶液高剂量组对抑郁模型大鼠海马组织中促炎症因子IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 的水平有明显的抑制作用。说明银杏蜜环口服溶液的抗抑郁作用可能与其抗炎作用有关。与正常组比较,模型组大鼠的NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$ 蛋白表达明显增加,提示CUMS刺激可以诱发P2RX7/NLRP3信号通路的激活,与既往实验结果相符;与模型组比较,银杏蜜环口服溶液高剂量组该通路蛋白的表达明显降低,表明银杏蜜环口服溶液对抑郁大鼠P2RX7/NLRP3信号通路具有明显的抑制作用。文献报道,氟西汀对CUMS刺激造成的抑郁模型大鼠NLRP3炎性小体相关蛋白的表达均有明显的抑制作用,但其对P2RX7表达无明显作用<sup>[14]</sup>,与本实验结果相符。

综上所述,银杏蜜环口服溶液可改善孤养结合CUMS刺激SD大鼠的抑郁样行为,其作用机制可能与调控P2RX7/NLRP3炎性小体信号通路,抑制该通路激活有关,且疗效与氟西汀相似。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] NOWAK G, SZEWCAYK B, WIERONSKA J M, et al. Antidepressant-like effects of acute and chronic

- treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats[J]. *Brain Res Bull*, 2003, 61(2):159-164.
- [ 2 ] MÜLLER N. Immunology of major depression [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2014, 21(2/3):123-130.
- [ 3 ] ZHANG Y, LIU L, PENG Y L, et al. Involvement of inflammasome activation in lipopolysaccharide - induced mice depressive-like behaviors [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(2):119-124.
- [ 4 ] ZHANG Y, LIU L, LIU Y Z, et al. NLRP3 inflammasome mediates chronic mild stress-induced depression in mice via neuroinflammation [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2015, 18(8):1-8.
- [ 5 ] IWATA M, OTA K T, DUMAN R S, The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses [J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 31:105-114.
- [ 6 ] 徐立,宋文婷,姚明江,等. 银杏蜜环口服溶液对多发性脑梗死大鼠模型的影响[J]. *世界中医药*, 2018, 13(1):25-30.
- [ 7 ] 郑咏秋,张业昊,刘建勋,等. 银杏蜜环口服溶液对缺氧缺糖再灌注诱导脑微血管内皮细胞和SH-SY5Y细胞炎性损伤的保护作用与机制[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(4):585-590.
- [ 8 ] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 93:358-64.
- [ 9 ] 宋文婷,刘建勋,姚明江,等. 银杏蜜环口服溶液减轻脑缺血再灌注大鼠脑梗死的实验研究[J]. *世界中医药*, 2018, 13(1):36-40.
- [ 10 ] 许鹏,章程鹏,周童. 中医药改善抑郁症发病机制的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20210326.
- [ 11 ] 张翕婷,王怡,李霖,等. 炎性因子与其他抑郁相关因素关系的研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(21):82-85.
- [ 12 ] BUFALINO C, HEPGUL N, AGUGLIA E, et al. The role of immune genes in the association between depression and inflammation: a review of recent clinical studies [J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 31: 31-47.
- [ 13 ] 薛瑞瑞,周寿红. NLRP3炎症小体在抑郁症中作用的研究进展[J]. *中南医学科学杂志*, 2018, 46(4): 441-443.
- [ 14 ] 朱琳,赵晓航. 炎性小体研究进展[J]. *生命科学*, 2014, 26(7):709-716.
- [ 15 ] 管杰彧,孙剑玥,徐亚娜,等. 平喘汤对哮喘小鼠模型NLRP3炎症小体活化的影响[J]. *世界中医药*, 2020, 15(23):3646-3652.
- [ 16 ] VIRGILIO F D, BEN D D, SARTI A C, et al. The P2X7 receptor in infection and inflammation [J]. *Immunity*, 2017, 47(1):15-31.
- [ 17 ] IWATA M, OTA KT, LI XY, et al. Psychological stress activates the inflammasome via release of adenosine triphosphate and stimulation of the purinergic type 2X7 receptor[J]. *Biol Psychiatry*, 2016, 80(1):12-22.
- [ 18 ] ALCOCER-GÓMEZ E, ULECIA-MORÓN C, MARÍN-AGUILAR F, et al. Stress-induced depressive behaviors require a functional NLRP3 inflammasome [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(7): 4874-4882.
- [ 19 ] YUE N, HUANG H, ZHU X, et al. Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1):102.
- [ 20 ] 赵妍,夏趁意,包怡敏,等. 银杏酮酯对抑郁大鼠行为及炎症细胞因子的影响[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(3):88-92.
- [ 21 ] 刘富群,高崎,王丹丹,等. 银杏酮酯对抑郁症大鼠抑郁样行为及NLRP3炎症小体的作用[J]. *上海中医药大学学报*, 2017, 31(5):60-65.
- [ 22 ] 吴俊芳. 现代神经科学研究方法[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2006.
- [ 23 ] 姚丽华,陈建新,王晓萍,等. 慢性应激联合孤养C57小鼠抑郁模型的研究[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2014, 23(1):23-24.
- [ 24 ] YAN T M, FAN W T, LIU L, et al. The effects of Xingnao Jieyu capsules on post-stroke depression are similar to those of fluoxetine [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(19):1765-1772.
- [ 25 ] 于琦,金光亮. 慢性不可预知应激加孤养制作中医抑郁大鼠模型的研究[C]//亚洲实验动物学会联合会. 亚洲实验动物学会联合会(AFLAS)第三次会议暨中国实验动物学会(CALAS)第八届学术年会论文集. 2008.
- [ 26 ] 王成龙,王林元,王景霞,等. 芍药内酯苷及芍药苷对慢性束缚应激配合孤养肝郁模型大鼠行为学及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(7):3121-3125.
- [ 27 ] 郝志红,李未鞅. 抗郁汤对孤养加慢性应激抑郁模型大鼠学习记忆能力及5-HT的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2012, 10(8):975-976.
- [ 28 ] SU W J, ZHANG Y, CHEN Y, et al. NLRP3 gene knockout blocks NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathway in CUMS-induced depression mouse model [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 322:1-8.

[责任编辑 周冰冰]