

## 母婴分离/束缚应激模型小鼠海马小胶质细胞变化及温阳解郁方的调节作用

余楷杰<sup>1</sup>, 高静静<sup>2</sup>, 巩子汉<sup>1</sup>, 张欢润<sup>1</sup>, 左阳<sup>3</sup>, 杨婧雯<sup>1</sup>, 岳广欣<sup>1\*</sup>, 梁媛<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700;

2. 开封市中医院, 河南 开封 475000; 3. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029)

**[摘要]** 目的: 观察母婴分离/束缚应激诱发焦虑抑郁小鼠海马小胶质细胞激活和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), 白细胞介素-6(IL-6), 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )表达情况, 探讨温阳解郁方抗焦虑抑郁的机制。方法: 84只雄性C57BL仔鼠于出生后第0天(PD0)随机分为空白组、束缚应激组和造模组, 造模组采取母婴分离结合束缚应激制备焦虑抑郁模型, 将造模组按随机数字表法分为模型组、温阳组、解郁组、温阳解郁组和氟西汀组。在离乳第21天(PD21)至成年第90天(PD90), 空白组、束缚应激组和模型组饲喂正常饲料, 其余饲喂药混饲料(温阳组、解郁组、温阳解郁组和氟西汀组用药剂量分别为5.85, 12.03, 16.71 g·kg<sup>-1</sup>及2.60 mg·kg<sup>-1</sup>)。采用旷场实验, O迷宫和社会交互实验评估模型组小鼠焦虑抑郁状态; 免疫组化法(IHC)观察海马小胶质细胞及离子钙接头蛋白-1(Iba-1)表达; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , Iba-1, 糖皮质激素受体(GR)mRNA表达水平。结果: 与空白组比较, 模型组小鼠5 min运动总路程和中央区活动时间显著减少( $P < 0.01$ ), 开臂活动时间与活动总路程明显减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 训练探索时间和辨别探查时间显著增加( $P < 0.01$ ), Iba-1蛋白及mRNA表达, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  mRNA表达水平显著升高( $P < 0.01$ ), GR mRNA表达水平显著降低( $P < 0.01$ ), IHC结果显示小胶质细胞的过度激活。与模型组比较, 温阳解郁方及氟西汀组小鼠5 min运动总路程和中央区活动时间显著上升( $P < 0.01$ ), 开臂活动时间显著上升( $P < 0.01$ ), 训练探索时间和辨别探查时间明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); Iba-1蛋白及mRNA表达, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  mRNA表达水平明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), GR mRNA表达水平显著上升( $P < 0.01$ ), IHC结果表明小胶质细胞的形态恢复; 温阳组和解郁组小鼠开臂活动时间显著上升( $P < 0.01$ ), 辨别探查时间明显降低( $P < 0.05$ ), Iba-1蛋白及mRNA表达, IL-6 mRNA表达水平明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 温阳组小鼠GR mRNA表达水平明显上升( $P < 0.05$ ), TNF- $\alpha$  mRNA表达水平明显降低( $P < 0.05$ ); 解郁组小鼠5 min运动总路程显著上升( $P < 0.01$ ), 训练探索时间明显降低( $P < 0.05$ ), IL-1 $\beta$  mRNA表达水平明显降低( $P < 0.05$ ), IHC结果表明两组小胶质细胞有所恢复。结论: 温阳解郁方的综合疗效和药理作用优于温阳方和解郁方, 其作用机制可能通过抑制母婴分离/束缚应激小鼠海马小胶质细胞的激活, 降低IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 等细胞因子的表达, 增加海马GR表达, 从而改善小鼠的焦虑抑郁样行为。

**[关键词]** 母婴分离; 束缚应激; 温阳解郁方; 小胶质细胞; 海马; 二仙汤; 逍遥散

**[中图分类号]** R2-0; R749.7+2; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)18-0049-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211837

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210726.1741.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-07-27 9:33

### Changes of Microglia in Hippocampus of Mice Induced by Maternal Separation with Restraint Stress and Regulatory Effect of Wenyang Jieyu Prescription

SHE Kai-jie<sup>1</sup>, GAO Jing-jing<sup>2</sup>, GONG Zi-han<sup>1</sup>, ZHANG Huan-run<sup>1</sup>, ZUO Yang<sup>3</sup>,

YANG Jing-wen<sup>1</sup>, YUE Guang-xin<sup>1\*</sup>, LIANG Yuan<sup>1</sup>

(1. Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

**[收稿日期]** 20210512(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81573846)

**[第一作者]** 余楷杰, 在读硕士, 从事情志病的中医药基础及方证相关研究, E-mail: 894543462@qq.com

**[通信作者]** \*岳广欣, 研究员, 博士生导师, 从事情志病中医药防治基础及方证相关研究, E-mail: yuegx73@hotmail.com

2. Kaifeng Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kaifeng 475000, China;
3. Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the activation of microglia in hippocampus of depressed and anxious mice induced by maternal separation with acute restraint stress and the expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), investigating the mechanism of Wenyang Jieyu prescription in treating anxiety and depression. **Method:** Eighty four male C57BL offspring were randomly divided into control group, acute restraint stress group and model group on postnatal day 0 (PD0). Maternal separation combined with acute restraint stress was used to prepare anxious and depressed model mice, dividing the model mice into model group, Wenyang, Jieyu, Wenyang Jieyu and fluoxetine group according to random number table method. During the period of PD21-PD90, the control, acute restraint stress and model mice were fed with normal diet, with the other groups fed with corresponding medicine mixed diet. The Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu groups were given 5.85, 12.03 and 16.71 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup> respectively. The fluoxetine group was given 2.60 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>. Open field, zero maze test and social interaction tests were used to evaluate the anxiety and depression of model mice. The expression of Iba-1 in hippocampal microglia was detected by immunohistochemistry (IHC). The mRNA expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , Iba-1 and glucocorticoid receptor (GR) were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the control group, total movement distance and time spent in central zone in 5 min of the model mice significantly decreased ( $P < 0.01$ ), time spent in opened arm and total movement distance decreased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), investigation time during testing and training increased significantly ( $P < 0.01$ ). The expression of Iba-1 protein and mRNA, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  mRNA significantly increased ( $P < 0.01$ ), the expression levels of GR mRNA significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The result of IHC staining showed that microglia were over activated. Compared with the model group, total movement distance and time spent in central zone in 5 min of mice in the Wenyang Jieyu and fluoxetine group significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Time spent in opened arm significantly increased ( $P < 0.01$ ). Investigation time during testing and training significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of Iba-1 protein and mRNA, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  mRNA significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of GR mRNA increased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). IHC staining showed the microglia recovered. Time spent in opened arm of mice in the Wenyang group and Jieyu group significantly increased ( $P < 0.01$ ), time spent investigating during testing decreased significantly ( $P < 0.05$ ), the expression levels of Iba-1 protein and mRNA, IL-6 mRNA significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of GR mRNA of mice in the Wenyang group significantly increased ( $P < 0.05$ ), the expression of TNF- $\alpha$  mRNA significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Total movement distance of mice in the Jieyu group increased significantly ( $P < 0.01$ ), time spent investigating during training decreased significantly ( $P < 0.05$ ), the expression level of IL-1 $\beta$  mRNA significantly decreased ( $P < 0.05$ ). IHC staining showed that microglia recovered partly in both groups. **Conclusion:** The comprehensive curative effect and pharmacological action of Wenyang Jieyu prescription were better than Wenyang prescription and Jieyu prescription. Wenyang Jieyu prescription can treat anxiety and depression in maternal separation and acute restraint stress mice, its possible mechanism may be related to the decreased activation of microglia, down-regulation of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  expression and up-regulation of GR expression.

**[Keywords]** maternal separation; acute restraint stress; Wenyang Jieyu prescription; microglia; hippocampus; Erxiantang; Xiaoyaosan

抑郁症是一种常见的慢性精神障碍疾病<sup>[1]</sup>,主要症状是情绪低落、厌倦生活、过度悲观、睡眠紊

乱、甚至产生自杀念头,严重影响患者的生活质量,其复发率、致残率及致死率高,目前全球患病率约

4.4%<sup>[2]</sup>,给公民健康造成重大威胁。由于临床上焦虑和抑郁常伴随发作<sup>[3]</sup>,患者常兼有恐惧、担忧、紧张不安等焦虑表现,相关研究多从焦虑和抑郁两方面设计行为学以检测动物造模及治疗效果。目前,焦虑抑郁的发病机制仍未清楚,主要涉及神经递质假说、神经炎症假说、下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴紊乱等。既往研究表明,海马神经炎症是焦虑抑郁的重要诱发因素之一,小胶质细胞是早期应激的关键靶点<sup>[4]</sup>,母婴分离诱导仔鼠小胶质细胞激活、促炎因子表达失衡,影响神经发生和学习、认知、情绪调节功能<sup>[5]</sup>。研究发现,母婴分离改变小鼠HPA轴的调节能力,较长时间的母婴分离会导致仔鼠HPA轴反应增强,这使得仔鼠成年期遭受束缚应激时产生更强烈的反应<sup>[6]</sup>。海马糖皮质激素受体(GR)负责调控HPA轴的高反应性,防止HPA轴过度激活进而改善神经内分泌的紊乱,而母婴分离导致HPA轴功能持续过度亢进,损害海马GR表达,负反馈调节机制失衡是焦虑抑郁发作的重要诱因之一<sup>[7]</sup>。临床上常采用5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI),三环类抗抑郁药(TCA),抗焦虑药物等进行治疗,但此类药物起效较慢,周期长,容易耐受,伴随而来还有严重的不良反应和停药反应。中医复方在治疗精神障碍性疾病中具有多靶点、多途径、多环节的优势,且不良反应较小,患者更容易接受,已成为近年来治疗研究的焦点之一。

从中医病机分析,母婴分离小鼠模型的病机是肝郁阳虚<sup>[8-10]</sup>。《医贯·龙雷相火论》云:“相火是水中之火,龙雷之火,寄于肝肾之间”,幼年时期阳气稚嫩、肾髓不足,肾封藏能力较弱,对外界刺激的适应与调整能力较低。遭受母婴分离刺激后,容易折伤肾中元阳相火。肾水不温则肝木升发无力,疏泄不及而肝郁,束缚应激后其肝郁阳虚程度加重<sup>[10]</sup>。目前证据表明,二仙汤(温阳方)和逍遥散(解郁方)具有确切的抗焦虑、抗抑郁作用,可改善细胞凋亡、突触可塑性、神经营养、神经递质、肠脑轴,HPA轴等<sup>[11-12]</sup>。课题组基于母婴分离+束缚应激肝郁阳虚证型,以温肾疏肝为法,对两方面进行结合形成温阳解郁方。目前证据表明其对突触可塑性、神经营养因子表达有良好调节作用,可有效抑制HPA轴的过度激活,但是否抗炎及其机制仍不明确<sup>[8,13-14]</sup>。为进一步明确温阳解郁方对海马炎症的调节作用及机制,本实验以母婴分离结合束缚应激制备焦虑抑郁模型小鼠,观察温阳、解郁,温阳解郁方对模型小鼠行为学、海马小胶质细胞激活及炎症因子表达,GR

受体表达的影响,探讨温阳解郁方治疗焦虑抑郁的机制,并观测三方的干预疗效及药理作用差异,反证母婴分离+束缚应激模型小鼠肝郁阳虚证型。

## 1 材料

**1.1 动物** 选用8周龄C57BL/6J小鼠,体质量20~24 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2016-0006,使用许可证号SYXK(京)2021-0017。于中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验中心适应性喂养1周后进行繁殖,自由进食进水,室温22~25℃,相对湿度30%~40%。动物实验已通过中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验中心实验动物伦理审查。

**1.2 药物及试剂** 实验用到中药饮片为仙茅、淫羊藿、巴戟天、当归、知母、黄柏、柴胡、白芍、白术、茯苓、生姜、薄荷、炙甘草,以上饮片由北京仟草中药饮片公司提供,批号分别为180314005,181008006,180823017,181109008,181017004,180601013,170211003,180824003,181016010,181101013,180720012,180524007,181022005,由中国中医科学院中医基础理论研究所岳广欣研究员鉴定均为正品;盐酸氟西汀胶囊(法国Patheon公司,20 mg/粒,批号20160029);兔血清,抗体稀释液,兔抗山羊免疫球蛋白(Ig)G,ABC工作液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为ZLI-9026,2LI-9029,ZB-2050,PK-6100);离子钙接头蛋白-1(Iba-1)一抗,DAB(英国Abcam公司,批号分别为ab5076,D5637);总RNA提取试剂盒,聚合酶链式反应(PCR)扩增试剂盒,Tween-20,TritonX-100(美国Promega公司,批号分别为Z3100,A6010,H5152,H5142);反转录试剂盒(杰辉生物科技发展有限公司,批号K1622);1%戊巴比妥钠(北京百诺威生物科技有限公司,批号ST3761)。

**1.3 仪器** C1000型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司);vs120-s6型数字切片扫描仪(日本Olympus公司);CM1850型冰冻切片仪(德国Leica公司);ND8000型超微量高通量分光光度计(美国Thermo公司);Ethovision3.0型行为分析软件(荷兰Noldus公司);SPX-150C型恒温恒湿箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);MB-102型振荡型恒温金属浴(杭州博日科技股份有限公司);自制旷场箱40 cm×40 cm×35 cm;XR-XZR209型O迷宫装置(上海欣软信息科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物造模、分组及干预** 将10只雄鼠和40只雌鼠,按雄雌比例1:4进行混居繁衍,孕鼠待产前单笼饲养,分娩后每窝子代小鼠保持在4~7只,以仔鼠出生作为第0天(PD0),PD0仔鼠随机分为空白组、束缚应激组和造模组,母婴分离造模后按随机数字表法分为模型组、温阳组、解郁组、温阳解郁组和氟西汀组,共7组,每组12只。模型制备:仔鼠分别于PD5~PD14进行母婴分离,先将母鼠移至新笼,再将子代小鼠移至孵育箱(32℃),每天进行3h的母婴分离建立动物模型,空白组,束缚应激组也按母婴分离的方法进行操作但时间少于10min。在小鼠离乳喂养至成年3月龄(PD90)后,除了空白组,其余各组均给予急性束缚应激:将小鼠装进50mL的透气离心管中,限制其活动,3h后放出,期间不予食物和饮水。2h后进行旷场试验、社会交互认知实验及O迷宫实验评价造模成功与否<sup>[15]</sup>。

**2.2 给药** 二仙汤选自《中医方剂临床手册》,逍遥散选自《太平惠民和剂局方》,温阳解郁方由两方组合而成,各方药物组成及用量如下:二仙汤(温阳方),仙茅9g,淫羊藿9g,巴戟天9g,当归9g,知母4.5g,黄柏4.5g;逍遥散(解郁方),柴胡15g,当归15g,白芍15g,白术15g,茯苓15g,生姜5g,薄荷5g,炙甘草7.5g;温阳解郁方,仙茅9g,淫羊藿9g,巴戟天9g,当归15g,知母4.5g,黄柏4.5g,柴胡15g,白芍15g,白术15g,茯苓15g,生姜5g,薄荷5g,炙甘草7.5g。一煎加入10倍水浸泡30min,武火煮开后文火煎煮1.5h,120目滤网过滤并静置12h,二煎加入8倍水,操作同上。将2次煎煮药液合并,静置过夜,水浴浓缩后进行真空干燥(80℃,6h),称质量并计算得药率,粉碎后置于4℃冰箱备用。根据《药理实验方法学》记载,20g小鼠与70kg人的体表面积折算的等效剂量比值为0.0026,二仙汤(温阳方)、逍遥散(解郁方)、温阳解郁方的临床用量(按70kg体质量的人计算)分别为45,92.5,128.5g,氟西汀成人临床用量为20mg,则温阳方组、解郁方组、温阳解郁方组和氟西汀组小鼠给药的等效剂量分别为5.85,12.03,16.71g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>及2.60mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,按成年鼠5g·d<sup>-1</sup>的进食量制作药物混合饲料,药/饲料量为23.4,48.12,66.84g·kg<sup>-1</sup>及10.4mg·kg<sup>-1</sup>,将药混合入饲料粉末中,加入适量纯净水压成条状,60℃烘干备用。在离乳PD21至成年PD90,空白组、束缚应激组和造模组饲喂正常饲

料,其余各组给予相应的药混饲料饲喂。

## 2.3 行为学检测

**2.3.1 旷场实验** 先将各组小鼠于实验室内适应60min。将小鼠放入旷场箱(40cm×40cm×35cm)中心点,设中心点附近20cm×20cm区域为中央区,记录5min小鼠运动总长度,中央区活动时间。每次试验后用75%乙醇清洗旷场装置以减少对后续小鼠的影响。采用荷兰Noldus公司Ethovision3.0软件分析行为学数据。

**2.3.2 O迷宫实验** O迷宫外径65cm,内径60cm,分别有开臂和闭臂,闭臂高10cm,O迷宫离地面高60cm。实验开始时将小鼠放入开臂上,头向闭臂,观察5min内小鼠的开臂停留时间、闭臂停留时间和活动总路程。采用荷兰Noldus公司Ethovision3.0软件分析行为学数据。

**2.3.3 社会交互认知实验** 参照文献[16]进行实验。先将实验鼠放置于旷场箱中适应15min。实验开始后,将一只同性别同种属的小鼠放入6cm×8cm×10cm的网笼中,然后将该网笼放置于40cm×40cm×35cm旷场箱的一侧中点,随即将实验鼠放置于旷场箱的另一侧,将金属网笼周围10cm的区域定义为接触区,随后记录前4min内,实验鼠进入接触区的时间;35min后,再按第1次的位置放入实验鼠,接触同一只接触鼠,再次记录4min内实验鼠进入接触区的时间;第1次测试中实验鼠进入接触区的时间称为训练探索时间,第2次测试中实验鼠进入接触区的时间称为辨别探索时间,辨别探索时间/2次探索时间之和即为辨别比率。采用荷兰Noldus公司Ethovision3.0软件分析行为学数据。

**2.4 动物取材** 行为学实验结束24h后,使用1%戊巴比妥钠腹腔注射小鼠进行麻醉(100mg·kg<sup>-1</sup>),每组随机选择6只,打开胸腔暴露心脏,剪开右心耳,心尖部进针后生理盐水冲洗血液,4%多聚甲醛灌注,解剖取全脑,置于4%多聚甲醛中固定12h,其后转移至30%蔗糖溶液进行脱水。各组其余小鼠快速麻醉后,断头取全脑,冰上迅速分离海马,液氮速冻,后转移至-80℃冰箱保存。

**2.5 海马小胶质细胞Iba-1染色** 脑组织包埋后行冰冻切片,箱体温度设置为-20℃,样品头温度为-17℃,切片厚度为30μm;切片于0.01mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液(PBS)中平衡30min后进行免疫组化染色,10%兔血清封闭1h;一抗(Iba-1 1:1000)4℃过夜;PBS冲洗3次,每次10min,二抗(1:200)室温孵育4h,DAB显色15min,PBS冲洗后贴片,风干,

梯度脱水后用中性树胶封片。使用数字切片扫描仪进行扫描,采集图像,观察小胶质细胞数量、形态,以积分吸光度 $IA$ 表示Iba-1的表达情况。

**2.6 Real-time PCR检测海马IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , Iba-1, GR mRNA水平** 总RNA提取按照SV Total RNA Isolation System试剂盒说明书进行,使用分光光度计测RNA浓度,检测提取的RNA纯度。第一链cDNA合成按照Thermo反转录试剂盒说明书进行,以合成的第一链cDNA为模板,用PCR扩增试剂盒进行Real-time PCR。反应体系为25  $\mu$ L,扩增条件:95  $^{\circ}$ C预变性2 min;95  $^{\circ}$ C变性15 s,60  $^{\circ}$ C延伸1 min,共40个循环。以 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内参基因,空白组为对照样本,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法检测相关细胞因子mRNA在海马区的表达水平。引物由生工生物工程(上海)有限公司设计合成,序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
IL-6	上游 AGAGATACAAAGAAATGATGGA	95
	下游 AGCTATGGTACTCCACAAGACCAGA	
IL-1 $\beta$	上游 CAGCAGGTTATCATCATC	190
	下游 CTCGCAGCAGCACATCAAC	
TNF- $\alpha$	上游 CAGCCGATGGGTTGTACCTT	81
	下游 TGTGGGTGAGGAGCACGTAGT	
Iba-1	上游 ATCAACAAGCAATTCCTCGATGA	144
	下游 CAGCATTTCGCTTCAAGGACATA	
GR	上游 AGCTCCCCCTGGTAGAGAC	120
	下游 GGTGAAGACGCAGAAACCTTG	
$\beta$ -actin	上游 CCGTGAAAAGATGACCCAGATC	73
	下游 CACAGCCTGGATGGCTACGT	

**2.7 统计学处理** 运用SPSS 19.0软件进行统计分析,统计图数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用One-way ANOVA进行组间数据比较,两组间比较采用最小显著性差异法(LSD)检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对小鼠旷场实验的影响** 与空白组比较,束缚应激组和模型组小鼠5 min运动总路程和中央区活动时间显著下降( $P<0.01$ ),模型组小鼠较束缚应激组显著下调( $P<0.01$ );与模型组比较,解郁组小鼠5 min运动总路程明显增加,温阳解郁方和氟西汀组小鼠5 min中央区活动时间及运动总路程均显著增加( $P<0.01$ )。见表2。

**3.2 对小鼠O迷宫实验的影响** 与空白组比

表2 温阳解郁方对各组小鼠旷场实验中5 min中央区活动时间和运动总路程的影响( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 2 Effect of Wenyang Jieyu prescription on total movement distance and time spent in central zone in 5 min of mice in open field test ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	中央区活动时间/s	运动总路程/mm
空白		23.06 $\pm$ 4.60	14 478.38 $\pm$ 1 697.86
束缚应激		17.54 $\pm$ 4.41 <sup>2)</sup>	12 422.35 $\pm$ 1 333.09 <sup>2)</sup>
模型		13.29 $\pm$ 3.32 <sup>2,4)</sup>	9 351.57 $\pm$ 1 189.29 <sup>2,4)</sup>
温阳	5.85	10.95 $\pm$ 3.13	9 854.92 $\pm$ 1 545.67
解郁	12.03	16.21 $\pm$ 3.22	11 173.17 $\pm$ 1 292.51 <sup>6)</sup>
温阳解郁	16.71	20.92 $\pm$ 4.31 <sup>6)</sup>	12 399.41 $\pm$ 2 207.28 <sup>6)</sup>
氟西汀	0.002 6	24.04 $\pm$ 3.43 <sup>6)</sup>	11 761.47 $\pm$ 1 368.05 <sup>6)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与束缚应激组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>5)</sup> $P<0.05$ ,<sup>6)</sup> $P<0.01$ (表3~6同)。

较,束缚应激组与模型组小鼠开臂活动时间显著缩短( $P<0.01$ ),活动总路程明显减少( $P<0.05$ ),闭臂活动时间有上调趋势,其中模型组差异有统计学意义( $P<0.01$ );与束缚应激组比较,模型组小鼠开臂活动时间显著缩短( $P<0.01$ ),闭臂活动时间明显延长( $P<0.05$ );与模型组比较,各给药组小鼠开臂活动时间显著延长( $P<0.01$ ),温阳解郁和氟西汀组疗效较优。闭臂活动时间有下调趋势,其中温阳解郁和氟西汀组差异有统计学意义( $P<0.05$ ),活动总路程有上升趋势,差异无统计学意义。见表3。

表3 温阳解郁方对各组小鼠O迷宫实验中开臂活动时间、闭臂活动时间和运动总路程的影响( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 3 Effect of Wenyang Jieyu prescription on time spent in opened arm and closed arm and total movement distance of mice in zero maze test ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	开臂活动时间/s	闭臂活动时间/s	活动总路程/mm
空白		30.32 $\pm$ 7.80	213.80 $\pm$ 45.13	8 588.28 $\pm$ 2 219.65
束缚应激		15.28 $\pm$ 5.77 <sup>2)</sup>	244.17 $\pm$ 30.59	5 560.95 $\pm$ 1 377.64 <sup>1)</sup>
模型		7.52 $\pm$ 2.86 <sup>2,4)</sup>	270.88 $\pm$ 16.81 <sup>2,3)</sup>	5 341.27 $\pm$ 2 843.19 <sup>1)</sup>
温阳	5.85	21.70 $\pm$ 10.9 <sup>6)</sup>	258.21 $\pm$ 21.08	5 949.53 $\pm$ 2 787.52
解郁	12.03	21.47 $\pm$ 9.73 <sup>6)</sup>	247.27 $\pm$ 39.81	5 946.87 $\pm$ 1 480.35
温阳解郁	16.71	24.75 $\pm$ 9.32 <sup>6)</sup>	231.10 $\pm$ 50.71 <sup>5)</sup>	6 742.51 $\pm$ 1 654.51
氟西汀	0.002 6	24.85 $\pm$ 8.67 <sup>6)</sup>	222.10 $\pm$ 66.39 <sup>5)</sup>	6 343.90 $\pm$ 2 347.60

**3.3 对小鼠社会交互认知实验的影响** 与空白组和束缚应激组比较,模型组小鼠训练探查时间和辨别探查时间显著延长( $P<0.01$ );与模型组比较,解郁、温阳解郁及氟西汀组小鼠训练探查时间和辨别

探查时间明显缩短( $P<0.05, P<0.01$ ),温阳组辨别探查时间明显缩短( $P<0.05$ )。温阳解郁和氟西汀组疗效较优。见表4。

表4 温阳解郁方对各组小鼠社会交互认知实验中训练探查时间和辨别探查时间的影响( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 4 Effect of Wenyang Jieyu prescription on investigation time during testing and training of mice in social interaction test ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	训练探查时间 /s	辨别探查时间 /s	辨别率
空白		46.36±17.37	40.11±9.16	0.46±0.10
束缚应激		49.23±14.30	45.54±11.85	0.48±0.07
模型		81.38±25.71 <sup>2,4)</sup>	66.73±12.13 <sup>2,4)</sup>	0.45±0.08
温阳	5.85	60.99±24.55	51.95±18.43 <sup>5)</sup>	0.46±0.18
解郁	12.03	53.58±22.36 <sup>5)</sup>	49.30±16.68 <sup>5)</sup>	0.48±0.15
温阳解郁	16.71	50.44±20.47 <sup>6)</sup>	47.93±16.64 <sup>5)</sup>	0.49±0.10
氟西汀	0.002 6	46.04±15.77 <sup>6)</sup>	46.05±11.27 <sup>6)</sup>	0.50±0.23

3.4 对各组小鼠海马CA1区Iba-1表达的影响 免疫组化结果显示,空白组海马小胶质细胞突起细长,呈分枝状的未激活状态。而束缚应激组与模型

组小鼠海马小胶质细胞胞体肿大,突起粗短,分支减少,多呈“阿米巴”样的激活状态。各给药组的小胶质细胞均有所恢复,形态接近空白组,以温阳解郁和氟西汀组改善效果更加明显。与空白组比较,束缚应激和模型组小鼠Iba-1表达显著升高( $P<0.01$ ),与束缚应激组比较,模型组小鼠Iba-1表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组Iba-1表达均显著降低( $P<0.01$ )。见图1,表5。

表5 温阳解郁方对各组小鼠海马CA1区Iba-1表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of Wenyang Jieyu prescription on expression of Iba-1 in hippocampal CA1 region of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Iba-1/IA
空白		8 206.52±631.97
束缚应激		9 010.28±594.67 <sup>2)</sup>
模型		10 674.45±1 627.90 <sup>2,4)</sup>
温阳	5.85	9 366.90±350.58 <sup>6)</sup>
解郁	12.03	9 105.73±572.56 <sup>6)</sup>
温阳解郁	16.71	9 265.36±655.37 <sup>6)</sup>
氟西汀	0.002 6	8 959.00±663.71 <sup>6)</sup>

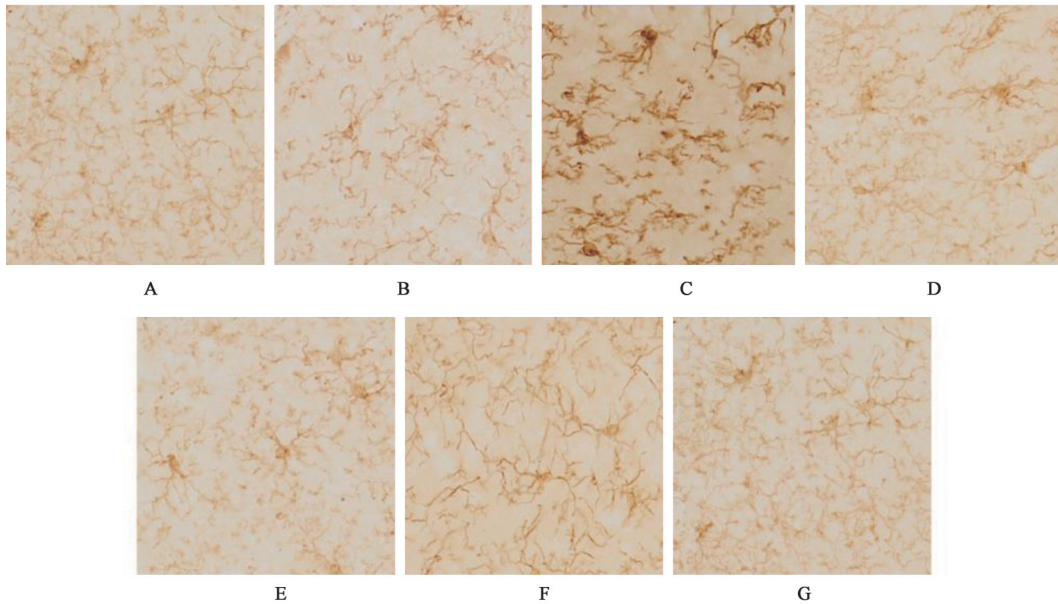


图1 温阳解郁方对小鼠海马CA1区Iba-1表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 1 Effect of Wenyang Jieyu prescription on expression of Iba-1 in hippocampal CA1 region of mice in each group(IHC,×200)

3.5 对小鼠海马组织IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , Iba-1和GR mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组GR的mRNA表达量显著下降( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组均有上调趋势,以温阳解郁和氟西汀组的调节作用更为显著( $P<0.01$ )。与空白组和束缚应激组比较,模型组IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Iba-1, IL-6的mRNA

表达量明显上调( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,温阳解郁和氟西汀组IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Iba-1, IL-6 mRNA表达明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),温阳组TNF- $\alpha$ , Iba-1, IL-6 mRNA表达明显降低( $P<0.05$ ),解郁组IL-1 $\beta$ , Iba-1, IL-6 mRNA表达明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。温阳解郁和氟西汀组的改善效果较显著。见表6。

表6 温阳解郁方对小鼠海马组织 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , Iba-1 和 GR mRNA 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 6 Effect of Wenyang Jieyu prescription on expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , Iba-1 and GR mRNA in hippocampus of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	GR	TNF- $\alpha$	Iba-1	IL-1 $\beta$	IL-6
空白		1.01±0.09	1.06±0.11	1.01±0.09	1.07±0.10	1.04±0.06
束缚应激		0.88±0.06	1.26±0.13 <sup>1)</sup>	1.17±0.16 <sup>1)</sup>	1.23±0.35	1.19±0.10
模型		0.77±0.11 <sup>2)</sup>	1.47±0.17 <sup>2,3)</sup>	1.78±0.11 <sup>2,3)</sup>	1.57±0.18 <sup>2,4)</sup>	1.60±0.17 <sup>2,4)</sup>
温阳	5.85	0.93±0.10 <sup>5)</sup>	1.25±0.08 <sup>5)</sup>	1.60±0.04 <sup>5)</sup>	1.40±0.19	1.38±0.09 <sup>5)</sup>
解郁	12.03	0.90±0.13	1.28±0.20	1.57±0.11 <sup>6)</sup>	1.36±0.11 <sup>5)</sup>	1.34±0.11 <sup>6)</sup>
温阳解郁	16.71	1.13±0.16 <sup>6)</sup>	1.25±0.18 <sup>5)</sup>	1.55±0.08 <sup>6)</sup>	1.33±0.14 <sup>5)</sup>	1.14±0.23 <sup>6)</sup>
氟西汀	0.002 6	1.11±0.17 <sup>6)</sup>	1.16±0.17 <sup>6)</sup>	1.55±0.15 <sup>6)</sup>	1.35±0.15 <sup>5)</sup>	1.18±0.16 <sup>6)</sup>

#### 4 讨论

近年来社会节奏的加快,焦虑抑郁的发病率逐年上升。临床治疗常用SSRI, TCA, 抗焦虑药物等,但此类药物存在严重的不良反应和停药反应,因此有必要寻求新的有效、安全的治疗方法。中医复方具有多靶点、多环节的优势,不良反应较小,更加契合临床的需要。二仙汤和逍遥散是治疗焦虑抑郁的经典名方,二仙汤出自《中医方剂临床手册》,由仙茅、淫羊藿、巴戟天、黄柏、知母、当归组成,方中淫羊藿、仙茅、巴戟天温肾阳,补肾精,当归养血柔肝和木,黄柏、知母滋肾阴以潜阳,全方有温肾补精之功<sup>[17]</sup>。逍遥散出自《太平惠民和剂局方》,由当归、白芍、柴胡、茯苓、白术、炙甘草、生姜、薄荷组成,其中柴胡、薄荷疏肝解郁,当归、白芍养血柔肝,茯苓、白术健脾祛湿,生姜温胃和中,炙甘草调和诸药,全方有疏肝解郁,养血健脾之效<sup>[18]</sup>。基于母婴分离模型病机分析属肝郁阳虚,课题组将两方结合后形成温阳解郁方。两方合用,肝、脾、肾同治,阴阳同调,疏肝行气而不伤正,温肾益精而不壅塞,标本兼治,共奏疏肝行气、温肾补精之效,主治肝郁阳虚证。

母婴分离是常用的动物模型<sup>[19]</sup>,可诱导仔鼠产生焦虑抑郁样行为。母婴分离结合束缚应激可以模拟遭受早年不良经历的人类成年后受到二次环境应激时所出现的情绪低落、社交活动减少、紧张、恐惧等焦虑抑郁的表现,被应用于探究早年不良经历导致个体成年后焦虑抑郁易感性病理机制。社会交互实验、旷场试验和O迷宫试验可以评估小鼠的社会互动、抑郁状况、探索能力及焦虑程度,是较常用的行为学检测方法<sup>[20-22]</sup>。其中训练与辨别探查时间反映小鼠的社交障碍抑郁情况,中央区活动时间反映小鼠的探索能力,运动总路程反映小鼠的自发活动及兴奋性,开臂停留时间反映小鼠的焦虑程度。本实验表明,模型组训练与探查时间显著上

升,5 min中央区活动时间和活动总路程显著减少,开放臂停留时间显著减少,说明模型组小鼠表现出社交逃避抑郁障碍,且探索能力及兴奋性降低、焦虑程度增加,模拟了焦虑抑郁患者社交减少、紧张焦虑的表现,与以往报道一致<sup>[23]</sup>,提示造模成功。

神经炎症是抑郁症的研究焦点之一,小胶质细胞作为中枢免疫的重要成分,参与维持脑内稳态,修复神经损伤,在受到不利应激后,其M1型极化失调,刺激细胞因子分泌,与抑郁症发作密切相关<sup>[24]</sup>,其中海马小胶质细胞的激活更是应激性抑郁的重要机制之一<sup>[25]</sup>。母婴分离小鼠成年后遭受二次应激促使海马小胶质细胞激活,并分泌大量促炎细胞因子如IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ <sup>[26]</sup>,炎症因子反过来又能进一步激活小胶质细胞,形成恶性循环<sup>[27]</sup>。小胶质细胞激活及炎症因子大量分泌不仅激活HPA轴,诱导糖皮质激素GC产生,还激活色氨酸犬尿氨酸代谢途径导致5-羟色胺合成减少,降低神经递质水平<sup>[28]</sup>,并且炎症还可以减少脑源性神经营养因子的产生,损害突触可塑性及海马神经发生<sup>[29]</sup>,导致抑郁样改变。临床上抑郁症患者也存在血清中IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 的表达水平增高,且症状严重程度与炎症因子表达水平存在相关性<sup>[30-31]</sup>,本次研究发现,与空白组比较,母婴分离结合束缚应激模型组小鼠海马小胶质细胞形态明显改变,由静息状态的“分枝状”转变为激活状态的“阿米巴样”,胞体肿大,突触短粗,小胶质细胞标志物Iba-1表达显著增加,IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  mRNA表达水平显著升高,与以往文献报道结果一致<sup>[32]</sup>,提示母婴分离+束缚应激诱导海马区小胶质细胞的激活及IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 的过度表达,这可能是导致小鼠产生焦虑抑郁样改变的病理机制之一。

母婴分离及束缚应激作为不良反应事件,是诱发HPA轴过度激活的重要因素<sup>[6]</sup>,HPA轴是机体的

关键反馈调节系统,调节免疫及应激反应,维持内分泌和糖皮质激素水平,其异常激活可影响负反馈机制,这与焦虑抑郁的发生有关<sup>[19]</sup>。GR在海马区中高表达<sup>[33]</sup>,是参与GC介导应激反应的低亲和性受体分子。在应激状态下GR与高表达水平的GC结合,参与介导HPA轴的负反馈调节,抑制HPA轴的过度应激反应。但持续应激后HPA轴的过度激活会削弱自身的负反馈调节,增强HPA轴的反应性,GC表达水平持续升高并损害海马GR受体的表达,使GR介导的负反馈机制失调,导致机体神经,免疫,内分泌等系统功能紊乱<sup>[34]</sup>,GR下调可使海马神经元凋亡萎缩<sup>[35]</sup>。其次,GR作为一种配体依赖的受体,被GC激活后可作用于核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)/激活蛋白-1(AP-1)信号通路是介导小胶质细胞分泌炎症因子的关键信号通路,GR可抑制这两种转录因子所诱导的促炎靶基因的转录,进而降低IL-1 $\beta$ ,IL-6,TNF- $\alpha$ 等炎症因子的释放<sup>[36]</sup>,而不良应激的持续刺激会过度激活HPA轴,导致海马区GR表达下调并介导炎症反应。本次研究表明,与空白组比较,母婴分离/束缚应激小鼠海马区GR mRNA表达显著减少,与以往文献结果一致<sup>[37]</sup>,说明海马区GR受体是介导应激反应及炎症因子表达的关键分子,GR表达水平受HPA轴及免疫炎症的影响,其表达受损与小鼠的焦虑抑郁样行为有关。

温阳解郁方通过抑制海马小胶质细胞的激活,降低炎症因子的表达,并促进海马GR受体表达发挥焦虑抑郁治疗作用。本次研究结果显示,与母婴分离+束缚应激模型组比较,温阳解郁组和氟西汀组小鼠的中央区活动时间及运动总路程,开放臂停留时间显著增加,训练及辨别探索时间显著降低,海马Iba-1蛋白及mRNA,IL-1 $\beta$ ,IL-6,TNF- $\alpha$  mRNA表达水平显著降低,GR mRNA表达水平显著升高,IHC染色显示海马区小胶质细胞形态恢复,呈静态“分枝状”,胞体肿大及突触短粗的状况有所恢复。在综合疗效及药理作用上,温阳解郁方的改善作用优于单纯的温阳方及解郁方。

综上,母婴分离小鼠束缚应激后表现出焦虑与抑郁样行为,海马区小胶质细胞过度激活及炎症因子的过量表达。温阳解郁方可能通过抑制海马区小胶质细胞的激活,增强海马区GR受体的表达,降低炎症因子表达,改善母婴分离+束缚应激小鼠的焦虑与抑郁样行为。其综合疗效及药理作用优于单纯的温阳组及解郁组,反证母婴分离+束缚应激模型小鼠肝郁阳虚的证型。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 李传朋,刘玉,魏品球,等. 逍遥散及其类方与有效成分抗抑郁作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(6):243-250.
- [2] MOKDAD A H, FOROUZANFAR M H, DAOUD F, et al. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. Lancet, 2016, 387 (10036): 2383-2401.
- [3] 崔利军,栗克清,严保平,等. 抑郁症共病其他精神障碍的特点及相关因素[J]. 中国心理卫生杂志,2010,24(8):592-596,603.
- [4] 韩岳. 小胶质细胞在早期生活应激所致行为异常中的作用机制研究[D]:成都:电子科技大学,2020.
- [5] BANQUERI M, MÉNDEZ M, GÓMEZ-LÁZARO E, et al. Early life stress by repeated maternal separation induces long-term neuroinflammatory response in glial cells of male rats[J]. Stress,2019,22(5):563-570.
- [6] GEHRAND A L, HOEYNECK B, JABLONSKI M, et al. Programming of the adult HPA axis after neonatal separation and environmental stress in male and female rats[J]. Endocrinology,2018,159(7):2777-2789.
- [7] HARTMANN J, BAJAJ T, KLENGEL C, et al. Mineralocorticoid receptors dampen glucocorticoid receptor sensitivity to stress via regulation of FKBP5 [J]. Cell Rep,2021,35(9):109185.
- [8] 岳广欣,张玲,卢贺起,等. 温阳解郁法对母婴分离小鼠行为模式及HPA轴功能的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2014,20(1):42-46.
- [9] 巫鑫辉,李娜,岳广欣. 留守儿童身心健康问题与中医理论认识[J]. 世界中西医结合杂志,2016,11(8):1170-1172.
- [10] 刘燕,邹小娟,丁秀芳,等. 基于复合应激的肝郁脾虚证小鼠模型的建立与评价[J]. 中华中医药杂志,2016,31(5):1840-1844.
- [11] 吴丹,高耀,邢婕,等. 逍遥散治疗肝郁脾虚型抑郁症的药理作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(8):187-193.
- [12] 罗武龙,陈洁,牛婕,等. 基于网络药理学的二仙汤治疗抑郁症的作用机制研究[J]. 中国药理学通报,2020,36(9):1317-1324.
- [13] 梁媛,张玲,卢贺起,等. 温阳解郁不同组方对母婴分离/社会击败应激小鼠影响的比较研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(9):2274-2277.
- [14] 王小雪,岳广欣,巫鑫辉,等. 抑郁症海马神经可塑性改变及中药调控作用研究现状[J]. 辽宁中医药大学学报,2017,19(4):80-84.

- [15] VAN ZYL P J, DIMATELIS J J, RUSSELL V A. Behavioural and biochemical changes in maternally separated Sprague-Dawley rats exposed to restraint stress[J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31(1): 121-133.
- [16] FRANKLIN T B, LINDER N, RUSSIG H, et al. Influence of early stress on social abilities and serotonergic functions across generations in mice[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21842.
- [17] 陈世洲,毛国庆,孙玉明,等. 加味二仙汤治疗阳虚骨质疏松症临床疗效及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7): 104-108.
- [18] 纪雅菲,芮翊馨,方洋,等. 逍遥散正丁醇部位基于IGF-1R $\beta$ /PI3K/Akt信号通路的抗抑郁作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(14): 1-11.
- [19] VETULANI J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition [J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(6): 1451-1461.
- [20] KULKARNI S K, SINGH K, BISHNOI M. Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2007, 29(5): 343-348.
- [21] GREGUS A, WINTINK A J, DAVIS A C, et al. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats [J]. *Behav Brain Res*, 2005, 156(1): 105-114.
- [22] 刘玲. 内侧前额叶皮层抑制性神经元在社会交互行为调控中的作用及神经机制研究[D]: 杭州: 浙江大学, 2020.
- [23] MATROV D, KōIV K, KANARIK M, et al. Middle-range exploratory activity in adult rats suggests higher resilience to chronic social defeat [J]. *Acta Neuropsychiatr*, 2016, 28(3): 125-140.
- [24] RESHETNIKOV V, RYABUSHKINA Y, KOVNER A, et al. Repeated and single maternal separation specifically alter microglial morphology in the prefrontal cortex and neurogenesis in the hippocampus of 15-day-old male mice [J]. *Neuroreport*, 2020, 31(18): 1256-1264.
- [25] WANG Y L, HAN Q Q, GONG W Q, et al. Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 21.
- [26] CALCIA M A, BONSALL D R, BLOOMFIELD P S, et al. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2016, 233(9): 1637-1650.
- [27] ROSENBLAT J D, MCINTYRE R S, ALVES G S, et al. Beyond monoamines-novel targets for treatment-resistant depression: a comprehensive review [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2015, 13(5): 636-655.
- [28] MILLER A H, RAISON C L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(1): 22-34.
- [29] KRISHNAN V, NESTLER E J. The molecular neurobiology of depression [J]. *Nature*, 2008, 455(7215): 894-902.
- [30] BEUREL E, TOUPS M, NEMEROFF C B. The bidirectional relationship of depression and inflammation: double trouble [J]. *Neuron*, 2020, 107(2): 234-256.
- [31] LEONARD B E. Inflammation and depression: a causal or coincidental link to the pathophysiology? [J]. *Acta Neuropsychiatr*, 2018, 30(1): 1-16.
- [32] THIBAUT F. Neuroinflammation: new vistas for neuropsychiatric research [J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2017, 19(1): 3-4.
- [33] HAN F, OZAWA H, MATSUDA K, et al. Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus [J]. *Neurosci Res*, 2005, 51(4): 371-381.
- [34] WILBER A A, SOUTHWOOD C J, WELLMAN C L. Brief neonatal maternal separation alters extinction of conditioned fear and corticolimbic glucocorticoid and NMDA receptor expression in adult rats [J]. *Dev Neurobiol*, 2009, 69(2/3): 73-87.
- [35] ANACKER C, CATTANEO A, MUSAELYAN K, et al. Role for the kinase SGK1 in stress, depression, and glucocorticoid effects on hippocampal neurogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(21): 8708-8713.
- [36] DE BOSSCHER K, VANDEN BERGHE W, HAEGEMAN G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors [J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 109(1): 16-22.
- [37] MANIAM J, MORRIS M J. Voluntary exercise and palatable high-fat diet both improve behavioural profile and stress responses in male rats exposed to early life stress: role of hippocampus [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2010, 35(10): 1553-1564.

[责任编辑 孙丛丛]