

逍遥散促进小胶质细胞极化改善血管性痴呆伴抑郁小鼠髓鞘再生及抑郁表型

单楠¹, 谭子虎^{1,2*}, 杨冰³, 马峥玲¹, 尹茜茜¹

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 湖北省中医院, 武汉 430061;
3. 湖北省第三人民医院, 武汉 430033)

[摘要] 目的:探讨逍遥散对血管性痴呆(VaD)小鼠抑郁行为表型的作用及可能机制。方法:3月龄雄性C57/BL6小鼠60只,分为正常组、模型组、氟西汀组及逍遥散低、中、高剂量组。除正常组外,其余5组小鼠采用双侧颈总动脉狭窄术,术后2周开始给予慢性束缚应激,每天6h,构建VaD伴抑郁小鼠模型;逍遥散低、中、高组予逍遥散水煎剂(5,10,20 g·kg⁻¹)灌胃,氟西汀组给予氟西汀(10 mg·kg⁻¹)灌胃,正常组、模型组给予等体积生理盐水灌胃,共计4周,给药期间给予束缚应激维持;糖水偏好试验、悬尾试验检测小鼠抑郁行为表型,免疫荧光法检测小鼠腹侧海马(vHIP)髓鞘碱性蛋白(MBP)荧光表达水平;透射电镜观察小鼠vHIP髓鞘超微结构;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测MBP,少突胶质细胞糖蛋白(MOG),髓鞘相关糖蛋白(MAG),髓样细胞触发性受体-2(TREM2),诱导型一氧化氮合酶(iNOS),精氨酸酶1(Arg1),白细胞介素-1 β (IL-1 β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-4(IL-4),白细胞介素-10(IL-10)蛋白表达水平。结果:行为学检测结果显示:与正常组比较,模型组小鼠不动时间增加、糖水偏好百分比下降($P<0.01$);与模型组比较,给予逍遥散干预后小鼠不动时间缩短($P<0.05$),糖水偏好百分比增加($P<0.01$);Western blot结果显示:与正常组比较,模型组小鼠vHIP中髓鞘相关蛋白(MBP,MOG,MAG)表达下降($P<0.01$);与模型组比较,低剂量组小鼠vHIP中MBP,MOG,MAG蛋白表达增加($P<0.05$, $P<0.01$),iNOS蛋白表达降低($P<0.01$),中、高剂量组MBP,MOG,MAG,TREM2,Arg1,IL-4,IL-10蛋白表达均增加($P<0.05$, $P<0.01$),iNOS,IL-1 β ,TNF- α 蛋白表达水平降低($P<0.01$);免疫荧光结果显示:与正常组比较,模型组小鼠MBP平均荧光强度降低($P<0.01$),低、中、高剂量组MBP平均荧光强度不同程度增加($P<0.01$);透射电镜结果显示:模型组髓鞘结构松散,致密层分离,排列紊乱,给予逍遥散干预改善小鼠髓鞘结构完整性及板层结构松散度。结论:逍遥散改善VaD小鼠的抑郁表型,其机制可能是通过上调TREM2诱导小胶质细胞M2型极化,增加其抗炎及吞噬能力,促进受损髓鞘再生。

[关键词] 血管性痴呆(VaD); 抑郁症; 逍遥散; 小胶质细胞; 髓鞘

[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)19-0019-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211803

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210728.1852.007.html>

[网络出版日期] 2021-07-29 11:00

Xiaoyaosan Promotes Myelin Regeneration and Alleviates Depressive Symptoms in Vascular Dementia Mice with Depression via Promoting Microglia Polarization

SHAN Nan¹, TAN Zi-hu^{1,2*}, YANG Bing³, MA Zheng-ling¹, YIN Xi-xi¹

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China;

3. The Third People's Hospital in Hubei Province, Wuhan 430033, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Xiaoyaosan on depressive behavioral phenotype in

[收稿日期] 20210427(001)

[基金项目] 武汉市科技计划应用基础前沿项目(2020020601012244)

[第一作者] 单楠,在读博士,从事中医药防治脑病的基础研究,Tel:027-88929217,E-mail:shannan0116@163.com

[通信作者] *谭子虎,博士,主任医师,博士生导师,从事中医药防治心脑血管疾病的临床与基础研究,Tel:027-88929217,E-mail:tanzihu2008@163.com

mice with vascular dementia (VaD) mice and its possible mechanism. **Method:** Sixty three-month-old male C57/BL6 mice were divided into the normal control group, model group, positive control group, as well as low-, medium-, and high-dose Xiaoyaosan groups. Mice in all groups except for the normal control group underwent bilateral carotid artery stenosis. Two weeks later, they were subjected to chronic restraint stress, 6 h per day, for inducing VaD complicated with depression. Mice in the low-, medium-, and high-dose Xiaoyaosan groups were treatment with intragastric administration of Xiaoyaosan decoction (5, 10, 20 g·kg⁻¹), the ones in the positive control group with fluoxetine (10 mg·kg⁻¹), and those in the normal control group and model group with an equal volume of normal saline for four weeks, during which the restraint stress was maintained. The depressive behavioral phenotype of mice was observed in sugar water preference test and tail suspension test. The fluorescence expression of myelin basic protein (MBP) in ventral hippocampus (vHIP) was detected by fluorescence immunoassay. The ultrastructure of myelin sheath in vHIP was observed by transmission electron microscopy. The protein expression levels of MBP, myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), myelin-associated glycoprotein (MAG), triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), arginase 1 (Arg1), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-4 (IL-4), and interleukin-10 (IL-10) were assayed by Western blot. **Result:** As revealed by behavioral test, compared with the normal control group, the model group exhibited prolonged immobility time and decreased percentage of sugar water preference ($P<0.01$). Compared with the model group, Xiaoyaosan significantly shortened the immobility time of mice ($P<0.05$) and increased the percentage of sugar water preference ($P<0.01$). Western blot results showed that the protein expression levels of MBP, MOG, and MAG in vHIP of the model group were remarkably decreased as compared with those of the normal control group ($P<0.01$). The protein expression levels of MBP, MOG, and MAG in vHIP of the low-dose Xiaoyaosan group were increased in contrast to those in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$), while the protein expression of iNOS was decreased ($P<0.01$). The protein expression levels of MBP, MOG, MAG, TREM2, Arg1, IL-4, and IL-10 in the medium- and high-dose Xiaoyaosan groups were up-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$), whereas those of iNOS, IL-1 β , and TNF- α were down-regulated ($P<0.01$). The immunofluorescence findings demonstrated that the mean fluorescence intensity of MBP in the model group declined in comparison with that in the normal control group ($P<0.01$), while the mean fluorescence intensities of MBP in the low-, medium-, and high-dose Xiaoyaosan groups were enhanced to different degrees ($P<0.01$). It was observed under the transmission electron microscope that the myelin structure of the model group was loosened and the dense layer was separated and irregularly arranged. Xiaoyaosan improved the structural integrity of myelin sheath and the looseness of lamellar structure. **Conclusion:** Xiaoyaosan ameliorates the depressive behavioral phenotype of VaD mice, which may be related to the up-regulation of TREM2, the induction of M2 polarization of microglia cells, the enhancement of their anti-inflammatory and phagocytic abilities, and the promotion of damaged myelin sheath regeneration.

[Keywords] vascular dementia (VaD); depression; Xiaoyaosan; microglia cells; myelin sheath

血管性痴呆(VaD)是仅次于阿尔茨海默病的第二大痴呆类型^[1]。随着心脑血管疾病患病率的显著增加, VaD发病率也呈明显上升趋势^[2]。获得性认知能力下降是痴呆的主要特征,但越来越多的证据表明,神经精神症状非常普遍,最常见的行为和情绪症状是抑郁、冷漠、躁动和易怒^[3]。尽管痴呆伴随的精神行为异常与认知障碍一起作为两大核心标准被纳入诊断指南^[4],但对其具体的病理生理机制目前仍缺乏足够的研究和认识。

目前认为,痴呆的本质是神经元死亡,以此为基础,精神行为异常与认知功能障碍在痴呆病程中相互促进影响。但临床实践中,精神行为异常与认知功能的线性下降之间常观察到分离现象^[5],单以神经元死亡还不能完全解释。除神经元损伤,白质病变和脱髓鞘是 VaD 的重要病理特征^[6]。髓鞘促进动作电位传导,是神经网络信息整合的关键要素。近年来研究不断发现,少突胶质细胞(OL)和髓鞘异常与精神性疾病发病密切相关^[7-9]。此外,一些脱髓

鞘疾病如多发性硬化症等,除运动-感觉功能异常外,也会有部分精神异常症状^[10]。因此,髓鞘受损很可能是VaD合并抑郁独立于神经元死亡以外的重要病理基础。

此外,痴呆伴随精神行为异常还缺乏安全有效的治疗方法,非药物干预在临床实践中常难以得到执行,而抗精神病药的使用反而加剧认知功能恶化,增加死亡风险^[11]。逍遥是源于宋代《太平惠民和剂局方》的经典名方。《医方考》中提到:“逍遥散,于调营扶土之中,用条达肝木,宣通胆气之法,最为解郁之善剂”。逍遥散能够通过调节抑郁症患者和抑郁模型动物机体异常代谢物水平、调节5-羟色胺能系统和下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴、激活脑源性神经营养因子通路及减轻神经炎症反应等机制发挥抗抑郁作用^[12-15]。因其符合整体调节、辨证论治、个体化诊疗等特点,在临床治疗抑郁症方面,显示了独特的理论优势和丰富的科学内涵优越性,已被广泛证实其安全性和有效性。临床研究也初步显示,逍遥散可以改善VaD伴随的抑郁症状,降低康耐尔痴呆抑郁量表评分及中医证候积分^[16-17]。因此,逍遥散可能成为改善VaD伴随精神行为异常的有效候选治疗方法。然而,VaD背景下逍遥散改善抑郁的作用机制还未被充分探索。

因此,本研究拟采用VaD合并抑郁动物模型,深入研究逍遥散对髓鞘结构和功能的影响及其具体作用机制,从而为逍遥散在痴呆伴随精神行为异常中的应用提供更充分的研究证据。

1 材料

1.1 动物 3月龄SPF级雄性C57BL/6小鼠,体重24~30 g,购自于湖北省实验动物中心,合格证号SCXK(鄂)2020-0018,均饲养于湖北省中医院实验动物中心,温度(21±3)℃,相对湿度(60±5)%,自由摄食饮水,12 h明暗交替。本实验获得湖北省中医院实验动物伦理委员会批准,伦理审批号为HBZY2020-C47-01。

1.2 药物 逍遥散剂量参照《方剂学》^[18]所载(60 kg成人日用量),由柴胡9 g,当归9 g,白术9 g,白芍9 g,茯苓9 g,生姜9 g,炙甘草4.5 g,薄荷1.5 g组成,均购于湖北省中医院药剂科,所有药材经原湖北省中医院黎鄂垣副主任药师鉴定符合2015年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)相关标准,浸泡30 min后,分3次煎煮,过滤合并水煎液,参照2015年版《中国药典》干燥失重法测定提取率^[19],本复方提取物收率为15.26%,最终给药

液的质量浓度为1.0 g·mL⁻¹。逍遥散低、中、高剂量通过人体用药量与小鼠换算(小鼠给药剂量=人给药剂量×换算系数=60 g·60 kg⁻¹·d⁻¹×9.1≈10 g·kg⁻¹·d⁻¹,得出剂量设定为逍遥散中剂量,取0.5倍5 g·kg⁻¹·d⁻¹,2倍剂量20 g·kg⁻¹·d⁻¹分别为逍遥散低剂量和高剂量,盐酸氟西汀胶囊(20 mg/片,法国Patheon France公司,批号J20170012),由湖北省中医院购得。

1.3 试剂 DAPI,BCA试剂盒,ECL显影液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C1006,P0012,P0018AM);一抗诱导型一氧化氮合酶(iNOS),精氨酸酶1(Arg1),髓鞘相关糖蛋白(MAG),少突胶质细胞糖蛋白(MOG),白细胞介素-4(IL-4),白细胞介素-10(IL-10),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为18985-1-AP,66129-1-Ig,14386-1-AP,12690-1-AP,66142-1-Ig,60269-1-Ig,60004-1-Ig);髓鞘碱性蛋白(MBP),髓样细胞触发性受体2(TREM2),肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-1β(IL-1β)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为78896s,76765,11948,63124);化学二抗羊抗鼠、羊抗兔(美国Jackson Immuno-Research公司,批号分别为115-005-003,111-005-003);荧光二抗驴抗兔(美国Southern-Biotech公司,批号6441-32)。

1.4 仪器 044BR8277型蛋白电泳及转印装置(美国伯乐公司),XM-650T型超声破碎仪(上海净信实业发展有限公司),Observer.Z1型全自动倒置荧光显微镜(德国蔡司公司),KHBST-360型酶标仪(上海科华生物工程股份有限公司),AllegraX-30R型高速冷冻离心机(美国Allegra公司),PXS-1040型电视显微镜(上海光学仪器厂),Tecnaig220 TWIN型超微透射电镜(美国FEI公司)。

2 方法

2.1 双侧颈总动脉狭窄(BCAS)法模型构建VaD小鼠模型 采用BCAS法制备^[20]。1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,剪开颈部正中皮肤,分离小鼠双侧颈总动脉。在体视显微镜下,将微型线圈(直径0.08 mm,内径0.18 mm,螺距0.5 mm,全长2.5 mm)以螺旋转入方式固定于双侧颈总动脉,造成双侧颈总动脉狭窄。2周后进行水迷宫试验,筛选认知功能障碍小鼠应用于后续实验。假手术组只分离颈总动脉,不予弹簧圈置入。

2.2 慢性束缚应激(CRS)方法 将通过筛选的VaD小鼠给予束缚应激(50 mL离心管管壁均匀开

小窗,供小鼠呼吸及散热),于每日固定时间上午9:00开始,束缚6h,假手术组只禁食禁水,不予束缚。

2.3 动物分组及给药 其中假手术/无束缚小鼠为正常组,将BCAS/CRS小鼠50只随机分为模型组、氟西汀组以及逍遥散低、中、高剂量组,每组10只,给药过程中同时继续CRS维持。其中逍遥散低、中、高剂量组分别给予5,10,20 g·kg⁻¹·d⁻¹浓度逍遥散煎剂给药,氟西汀组予氟西汀按10 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量给药。逍遥散水煎剂与氟西汀均按照小鼠体质量100 mL·kg⁻¹灌胃给药,正常组和模型组每日予等量生理盐水,每日1次,共计4周。

2.4 动物处理及取材 小鼠行为学检测后,随机取4只,1%戊巴比妥麻醉,4%多聚甲醛心脏灌注后取脑,蔗糖溶液梯度脱水,包埋,冰冻切片后置入防冻液,-20℃保存,用于免疫荧光染色;6只小鼠取新鲜脑组织,取腹侧海马(vHIP)区装于不同离心管,随机取其中3只小鼠的vHIP切取1 mm³新鲜组织戊二醛固定,用于超微透射电镜,剩余新鲜海马组织分装,-80℃保存,用于蛋白免疫印迹实验。

2.5 行为学检测方法

2.5.1 悬尾实验 悬尾实验是对动物抑郁行为进行研究的经典行为学方法,测试时在距小鼠尾尖约2 cm处用医用胶布固定悬挂在离地面20 cm处,使小鼠呈倒悬状态,记录6 min测试时间内后4 min小鼠放弃挣扎的不动时间。

2.5.2 糖水偏好实验 测试前训练小鼠适应含糖饮水,每笼同时放置2个水瓶,第1个24 h内,2瓶均为1%蔗糖水,随后的24 h,一个水瓶盛1%蔗糖水,另一个水瓶为纯水。正式测试时,首先禁食禁水24 h,再每只小鼠给予事先定量好1瓶1%蔗糖水和1瓶纯水,测试期间每6 h更换水瓶位置,24 h后,取2瓶水称量,计算小鼠的总液体消耗、糖水消耗、纯水消耗,糖水偏好=糖水消耗/总液体消耗×100%。

2.6 免疫荧光染色 取脑片贴于玻片上,待干,组化笔画圈,0.5%Triton破膜40 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗3遍,5%BSA封闭1 h,1抗(MBP 1:1 000稀释)4℃过夜,弃1抗,PBS洗3遍,二抗(1:500稀释)室温孵育4 h后,弃二抗,PBS洗3遍,DAPI封片,荧光显微镜采集图像。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 分别取适量脑组织加入RIPA裂解液,在超声下破碎,4℃下,12 000 r·min⁻¹离心20 min(离心半径7 cm)取上清,BCA试剂盒检测蛋白浓度,配平待

测。每孔蛋白上样量为20 μg,电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,一抗(1:1 000)4℃过夜;PBS洗3遍,二抗室温孵育2 h(1:1万);PBS洗3遍,ECL发光液使条带可视化,Image J测条带灰度值进行分析。

2.8 透射电镜观察vHIP组织髓鞘超微结构 新鲜vHIP组织块戊二醛固定4 h;20℃下1%锇酸缓冲液固定2 h;梯度乙醇脱水;依次用丙酮:环氧树脂(2:1),丙酮:环氧树脂(1:1),环氧树脂37℃恒温下渗透;环氧树脂包埋;超薄切片,厚度为70 nm;铅铀双染色15 min,超微透射电镜下观察拍照。

2.9 统计学分析 采用Graphpad Prism 8.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用ANOVA单因素方差分析,两组间比较采用Turkey事后检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对BCAS/CRS小鼠抑郁行为表型的影响 与正常组比较,BCAS/CRS小鼠在悬尾试验中不动时间增加($P<0.01$),与模型组比较,逍遥散中、高剂量逍遥散干预后,BCAS/CRS小鼠的不动时间不同程度的缩短($P<0.05$, $P<0.01$),其中中剂量组、高剂量组与氟西汀组比较,不动时间差异均无统计学意义。糖水偏好实验中,小鼠对甜味溶液的偏好降低可反应小鼠抑郁状态下的快感缺乏,结果显示,与正常组比较,BCAS/CRS小鼠糖水偏好百分率显著下降($P<0.01$),予逍遥散与氟西汀干预后,与模型组比较,BCAS/CRS小鼠糖水偏好百分比均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),其中高剂量组改善最为明显,与氟西汀组比较,中剂量组、高剂量组作用较明显,但差异无统计学意义。见表1。

表1 逍遥散对BCAS/CRS小鼠抑郁状态的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of Xiaoyaosan on depression behavior of BCAS/CRS mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	不动时间/s	糖水偏好/%
正常		94.10±17.97	80.50±3.02
模型		145.48±23.11 ¹⁾	54.00±5.43 ¹⁾
氟西汀	0.01	102.74±20.43 ²⁾	65.60±7.47 ²⁾
逍遥散	5	134.24±17.08	57.00±10.65
	10	113.07±12.82 ²⁾	67.60±10.55 ³⁾
	20	104.64±17.25 ³⁾	75.28±6.87 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表2.5同)。

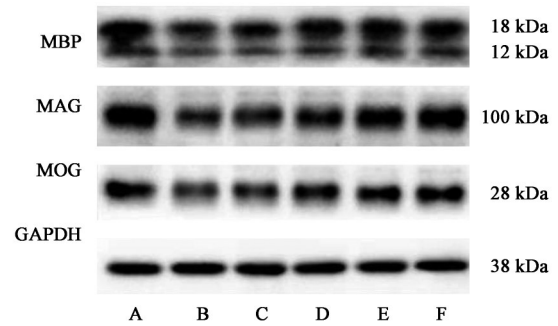
3.2 对BCAS/CRS小鼠vHIP髓鞘损伤的影响

3.2.1 对BCAS/CRS小鼠vHIP髓鞘相关蛋白表达水平的影响 与正常组比较,BCAS/CRS小鼠vHIP

内MBP, MAG, MOG髓鞘相关蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,给予逍遥散干预后, vHIP髓鞘相关蛋白表达水平随剂量增加不同程度地增加($P<0.05, P<0.01$);而氟西汀干预未能明显改变BCAS/CRS小鼠髓鞘蛋白表达,差异无统计学意义。见图1,表2。

3.2.2 对BCAS/CRS小鼠vHIP髓鞘超微结构的影响 正常组小鼠vHIP髓鞘结构完整,板层结构排列紧凑规则,边缘光滑;模型组vHIP髓鞘结构松解,致密层分离,排列紊乱,出现空泡样改变;给予逍遥散和氟西汀干预后,BCAS/CRS小鼠vHIP髓鞘超微结构较有序,板层结构松散程度减轻,其中高剂量组髓鞘结构完整性改善最为明显。见图2。

3.2.3 对BCAS/CRS小鼠MBP荧光表达的影响 与正常组比较,模型组vHIP中CA1区和DG区MBP荧光强度明显减少($P<0.01$);与模型组比较,给予逍



A. 正常组;B. 模型组;C. 氟西汀组;D. 逍遥散低剂量组;E. 逍遥散中剂量组;F. 逍遥散高剂量组(图2~5同)

图1 各组小鼠vHIP MBP, MAG, MOG蛋白电泳
Fig. 1 Electrophoresis of MBP, MAG and MOG myelin associated proteins in vHIP in each group

遥散干预后,逍遥散低、中、高剂量组MBP荧光表达强度不同程度的增加($P<0.01$),氟西汀组MBP荧光表达强度增加($P<0.01$);与氟西汀组比较,高剂量组对MBP荧光表达的影响更明显。见图3,表3。

表2 逍遥散对BCAS/CRS小鼠vHIP髓鞘相关蛋白相对表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Xiaoyaosan on myelin associated protein expression level in vHIP of BCAS/CRS mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MBP/GAPDH	MAG/GAPDH	MOG/GAPDH
正常		1.00±0.23	1.00±0.13	1.00±0.10
模型		0.50±0.10 ¹⁾	0.32±0.83 ¹⁾	0.44±0.09 ¹⁾
氟西汀	0.01	0.63±0.10	0.49±0.10	0.52±0.08
逍遥散	5	0.79±0.09 ²⁾	0.63±0.13 ³⁾	0.65±0.12 ²⁾
	10	0.83±0.22 ²⁾	0.72±0.15 ³⁾	0.70±0.15 ³⁾
	20	0.85±0.16 ³⁾	0.86±0.15 ³⁾	0.73±0.09 ³⁾

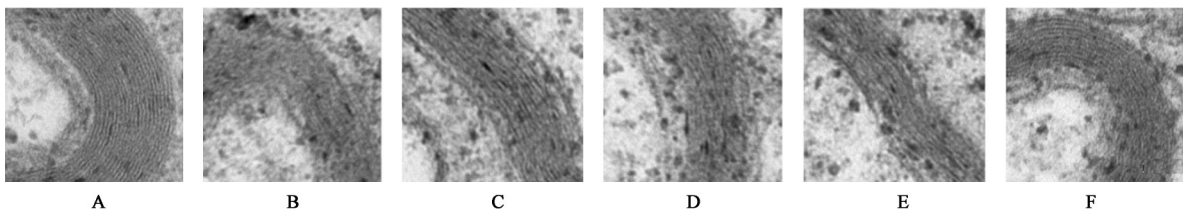


图2 逍遥散对BCAS/CRS小鼠vHIP髓鞘超微结构的影响(电镜扫描,×25 000)

Fig. 2 Effect of Xiaoyaosan on ultrastructure of myelin sheath in vHIP region of BCAS/CRS mice (SEM, ×25 000)

3.3 对BCAS/CRS小鼠vHIP脑区小胶质细胞极化的影响

3.3.1 对BCAS/CRS小鼠vHIP小胶质细胞M1型, M2型相关蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠TREM2, iNOS表达增加, Arg1表达降低($P<0.01$);与模型组比较,低剂量组iNOS蛋白表达下调($P<0.01$), TREM2蛋白表达下调($P<0.05$), Arg1表达差异无统计学意义,逍遥散中、高剂量组TREM2, Arg1蛋白表达上调, iNOS蛋白表达下调($P<0.01$), 氟西汀组差异无统计学意义。见

图4,表4。

3.3.2 对BCAS/CRS小鼠vHIP炎症的影响 与正常组比较,模型组促炎因子TNF- α , IL-1 β 及抗炎因子IL-4, IL-10蛋白表达水平均有所增加($P<0.01$);与模型组比较,逍遥散低、中、高剂量逍遥散组促炎因子TNF- α , IL-1 β 蛋白表达水平均下调($P<0.01$), 抗炎因子IL-4, IL-10蛋白表达水平被上调($P<0.01$), 氟西汀组促炎因子TNF- α 蛋白表达水平下调($P<0.05$), IL-4, IL-10蛋白表达水平均上调($P<0.01$);与氟西汀组比较,高剂量改善vHIP炎症状态

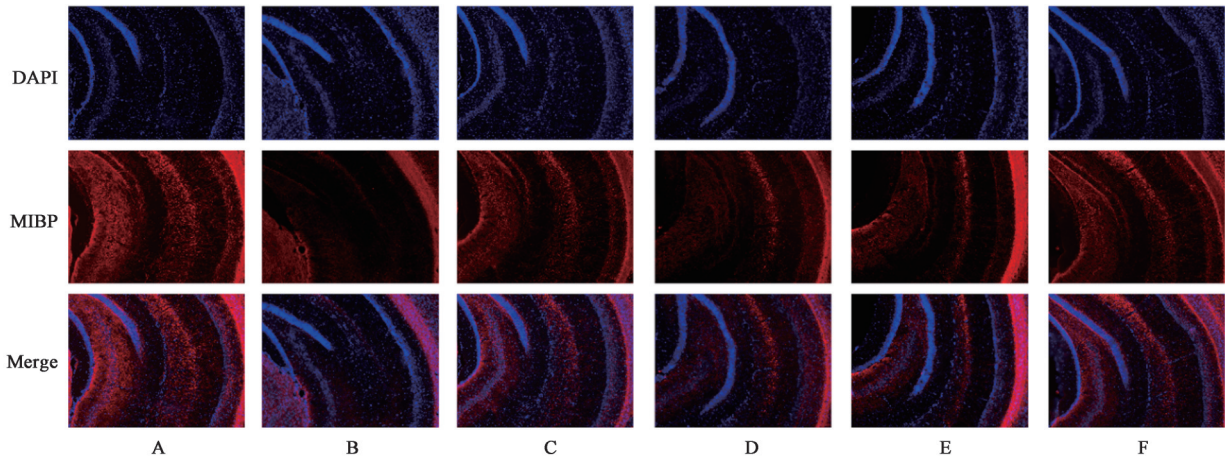


图3 逍遥散对BCAS/CRS小鼠vHIP中CA1区和DG区MBP表达的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 3 Effect of Xiaoyaosan on MBP immunofluorescence staining of CA1 and DG region in vHIP of BCAS/CRS mice (IF, ×100)

表3 逍遥散对BCAS/CRS小鼠vHIP中CA1区和DG区MBP的平均荧光强度的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Xiaoyaosan on average fluorescence intensity of MBP in CA1 region and DG region in vHIP of BCAS/CRS mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IA
正常		89.94±7.24
模型		26.95±6.68 ¹⁾
氟西汀	0.01	52.52±5.30 ³⁾
逍遥散	5	49.65±7.26 ³⁾
	10	55.07±7.23 ³⁾
	20	77.14±6.69 ^{3,4)}

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01;与氟西汀组比较⁴⁾P<0.01(表4同)。

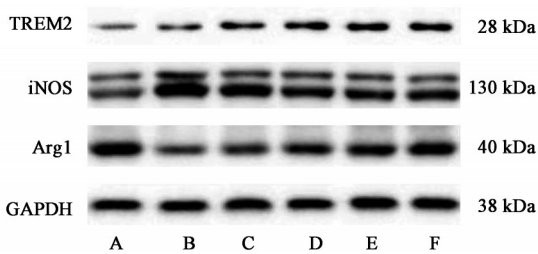


图4 各组小鼠vHIP小胶质细胞M1型,M2型相关蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis diagram of M1 and M2 related proteins in microglia in vHIP brain region of mice in each group

效果更为明显。见表5,图5。

4 讨论

抑郁是VaD常见的精神合并症^[21-22],且患病率显著高于阿尔茨海默病患者^[23]。抑郁行为的产生是内外因素综合作用的结果。慢性应激压力是导致抑郁等情绪障碍最重要的原因^[24],然而,不是所有动物面对应激均产生抑郁等行为异常;大脑情绪调节系统的稳定状态决定了对应激产生行为异常

的易感性和恢复力^[25]。通过BCAS模拟慢性脑低灌注,结合CRS模拟VaD常有的行动受限,这一VaD合并抑郁模型结合生理变化和应激压力,在此前研究中已被证实显著增加动物对应激的易感性,具有很好的表面效度和建构效度;而单纯慢性低灌注组动物仅有20%~25%产生抑郁行为表型,预测效度不适于药物研究^[26]。因此,在本研究中应用该模型,以更好的针对逍遥散的作用及机制进行探讨。结果显示,与正常组比较,BCAS/CRS小鼠表现出明显的抑郁行为,糖水消耗实验中模型组小鼠糖水消耗明显减少,悬尾实验中小鼠不动时间显著增加;表明BCAS/CRS小鼠较好地模拟了VaD合并抑郁表型。逍遥散干预显著增加BCAS/CRS小鼠糖水偏好百分比,并减少悬尾实验的不动时间,改善BCAS/CRS小鼠抑郁行为表型。

如前言所述,髓鞘受损很可能是VaD合并抑郁且独立于神经元死亡以外的重要病理基础,因此,检测了逍遥散对小鼠vHIP脑区髓鞘蛋白变化及髓鞘超微结构的影响。vHIP是大脑情绪回路的关键节点^[27],通过与伏隔核等情绪核团的相互投射,双向调节机体面对应激的抑郁样行为易感性^[28-29]。结果显示,BCAS/CRS小鼠vHIP髓鞘相关蛋白表达显著降低;同时髓鞘结构松解,致密层分离,排列紊乱,出现空泡样改变;而逍遥散可以部分逆转这一改变。因此,研究结果提示,减轻VaD髓鞘损伤,是逍遥散改善BCAS/CRS抑郁行为的重要作用机制。

进一步对逍遥散减轻VaD髓鞘损伤的具体细胞分子机制进行了探索。髓鞘损伤后,机体启动包括少突胶质前体细胞迁移、增殖、分化成新的少突胶质细胞并重新包裹轴突形成髓鞘等一系列复杂过程,以恢复轴突传导功能。其中,对原有髓鞘碎

表4 逍遥散对BCAS/CRS小鼠vHIP脑区小胶质细胞M1型,M2型相关蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Xiaoyaosan on expression of M1 and M2 related proteins in microglia in vHIP brain region of BCAS/CRS mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TREM2/GAPDH	iNOS/GAPDH	Arg1/GAPDH
正常		1.00±0.11	1.00±0.11	1.00±0.12
模型		1.94±0.17 ¹⁾	3.25±0.28 ¹⁾	0.37±0.12 ¹⁾
氟西汀	0.01	2.20±0.23	2.92±0.24	0.41±0.07 ³⁾
逍遥散	5	2.32±0.33 ²⁾	2.80±0.19 ³⁾	0.50±0.09
	10	2.56±0.10 ³⁾	2.54±0.15 ³⁾	0.63±0.05 ^{3,4)}
	20	3.24±0.22 ³⁾	2.12±0.17	0.80±0.08 ^{3,4)}

表5 逍遥散对BCAS/CRS小鼠vHIP中TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Xiaoyaosan on expression of TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10 proteins in vHIP of BCAS/CRS mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α /GAPDH	IL-1 β /GAPDH	IL-4/GAPDH	IL-10/GAPDH
正常		1.00±0.12	1.00±0.22	1.00±0.15	1.00±0.11
模型		4.07±0.55 ¹⁾	3.23±0.37 ¹⁾	1.45±0.18 ²⁾	1.79±0.39 ¹⁾
氟西汀	0.01	3.23±0.65 ²⁾	2.80±0.46	2.34±0.35 ³⁾	3.65±0.38 ³⁾
逍遥散	5	2.80±0.25 ³⁾	2.52±0.38 ³⁾	2.23±0.14 ³⁾	3.60±0.17 ³⁾
	10	2.46±0.34 ³⁾	2.18±0.27 ³⁾	3.56±0.26 ³⁾	3.65±0.43 ³⁾
	20	1.81±0.28 ³⁾	1.43±0.16 ³⁾	3.97±0.15 ³⁾	4.09±0.58 ³⁾

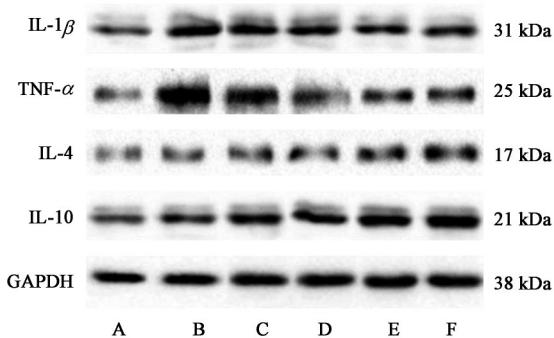


图5 各组小鼠vHIP中TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10蛋白电泳
Fig. 5 Electrophoresis diagram of TNF- α , IL-1 β , IL-4 and IL-10 in vHIP of mice in each group

片的清除是髓鞘再生过程中的关键步骤^[30-32]。髓鞘破坏后产生的髓鞘碎片刺激炎症反应和抑制神经修复,还抑制增殖的少突胶质前体细胞分化成熟为髓鞘化OL。这一碎片吞噬清除过程需要小胶质细胞(MG)向M2吞噬型的极化激活^[33]。MG是维持中枢神经系统稳态的免疫细胞,当MG表现为M1促炎表型时,吞噬能力和趋化性降低^[34],并分泌IL-6, TNF- α 等促炎因子加重神经炎症和髓鞘损害^[35]。MG的极化激活受TREM2调控, TREM2作为免疫球蛋白超家族中的一种,主要在MG中表达,是MG细胞膜上的关键感受器,介导对磷脂,载脂蛋白E(ApoE)和其他刺激的反应。TREM2激活配体向胞内传递信号,进而激活下游信号级联通路,调节细胞增殖、吞噬、成熟和炎症反应^[36]。研究显示,敲低

TREM2表达可以减弱缺血性卒中小鼠MG吞噬活性,增加TNF- α , IL-1 β 和iNOS并抑制IL-10的产生^[37]。而TREM2过表达可以抑制TNF- α , IL-1 β 和iNOS并增加IL-10的产生^[38]。蛋白免疫印迹结果显示,逍遥散增加BCAS/CRS小鼠vHIP中TREM2表达,增加M2表型的标记蛋白Arg1及其分泌的抗炎因子IL-4, IL-10表达,减少M1型的标记蛋白iNOS以及促炎因子IL-1 β , TNF- α 水平。证实逍遥散通过上调TREM2表达,调节MG向M2表型转化,增加其吞噬及抗炎能力,促进髓鞘再生。

逍遥散是《太平惠民和剂局方》中的名方,由柴胡、当归、芍药、白术、茯苓、甘草、薄荷、生姜共八味药物组成,肝脾同调,气血兼顾,刚柔相济,疏散有度。VaD因气血亏虚、脑窍失养以致髓海不足,脑对各种刺激的感觉、知觉、记忆等认知过程以及形成决策、调动和整合其他脏器的功能活动减弱。肝主疏泄,调畅全身气机,推动精、气、血、津液等物质生成、输布和运行,为人体气血调控枢纽。脑为“髓海”,肝为“血海”,主藏血,精血同源,精能生血,血能化精,“精汁清者,入髓府化髓”。逍遥散疏肝解郁、气血条达,精血津液之精华上达头目,充髓养神,而最终达到改善痴呆患者伴随精神行为异常的目的,多项研究也证实逍遥散通过中枢调节作用改善抑郁行为^[39-40]。更重要的是,逍遥散在长期临床应用,充分证实了其安全性和有效性,结合研究

结果,逍遥散可能是治疗 VaD 伴精神行为异常的更好选择。

综上所述,逍遥散改善 VaD 模型小鼠抑郁行为表型,其机制可能部分是通过上调 TREM2 表达,调节 MG 向 M2 表型转化,增加对髓鞘碎片吞噬能力,减轻局部炎症反应,促进髓鞘再生。同时,逍遥散不同干预机制在其改善 VaD 伴精神行为异常中的影响权重,值得在未来进一步研究评估,从而以实现对疾病更精准的治疗。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] IADECOLA C, DUERING M, HACHINSKI V, et al. Vascular cognitive impairment and dementia: JACC Scientific Expert Panel[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(25):3326-3344.
- [2] HACHINSKI V. Brain health-curbing stroke, heart disease, and dementia: the 2020 Wartenberg Lecture [J]. *Neurology*, 2021, doi: 10.1212/WNL.0000000000012103.
- [3] VERREAULT P, TURCOTTE V, OUELLET M C, et al. Efficacy of cognitive-behavioural therapy interventions on reducing burden for caregivers of older adults with a neurocognitive disorder: a systematic review and meta-analysis [J]. *Cogn Behav Ther*, 2021, 50(1):19-46.
- [4] 《中国痴呆与认知障碍指南》写作组,中国医师协会神经内科医师分会认知障碍疾病专业委员会. 2018 中国痴呆与认知障碍诊治指南(一):痴呆及其分类诊断标准[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(13):965-970.
- [5] KALES H C, GITLIN L N, LYKETSOS C G. Assessment and management of behavioral and psychological symptoms of dementia [J]. *BMJ*, 2015, 350(27):369.
- [6] WANG M H, QIN C, LUO X, et al. Astrocytic connexin 43 potentiates myelin injury in ischemic white matter disease [J]. *Theranostics*, 2019, 9(15):4474-4493.
- [7] HOWES O D, MURRAY R M. Schizophrenia: an integrated sociodevelopmental-cognitive model [J]. *Lancet*, 2014, 383(9929):1677-1687.
- [8] HAGEMEYER N, GOEBBELS S, PAPIOL S, et al. A myelin gene causative of a catatonia-depression syndrome upon aging [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(6):528-539.
- [9] CZÉH B, NAGY S. A clinical findings documenting cellular and molecular abnormalities of glia in

- depressive disorders [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, doi:10.3389/fnmol.2018.00056.
- [10] POGGI G, BORETIUS S, MOBIUS W, et al. Cortical network dysfunction caused by a subtle defect of myelination [J]. *Glia*, 2016, 64(11):2025-2040.
- [11] MAUST D T, KIM H M, SEYFRIED L S, et al. Antipsychotics, other psychotropics, and the risk of death in patients with dementia: number needed to harm [J]. *JAMA Psychiatry*, 2015, 72(5):438-445.
- [12] JI Y F, LUO J Z, JIU S, et al. Xiaoyao pills ameliorate depression-like behaviors and oxidative stress induced by olfactory bulbectomy in rats via the activation of the PIK3CA-AKT1-NFE2L2/BDNF signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:643456.
- [13] GUO R, QIN W S, ZHANG S Y, et al. Effects of modified Xiaoyao San on TLR4/NF- κ B pathway in hippocampal microglia of LPS-induced depression model rats [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2020, 36(4):354-357.
- [14] JIN X, JIANG M L, GONG D D, et al. Efficacy and safety of Xiaoyao formula as an adjuvant treatment for post-stroke depression: a meta-analysis [J]. *Explore (NY)*, 2018, 14(3):224-229.
- [15] YANG H R, LIU L N, FEI G, et al. Effect of Xiaoyao San on OVX combined with CUS anxiety and depression model rats based on hippocampal microglia M1 polarization [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 2020, 45(20):4964-4970.
- [16] 周云. 逍遥散治疗肝郁脾虚型老年性痴呆伴抑郁患者的临床观察[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2015.
- [17] 沈莹,余鸽,张海生. 逍遥丸联合盐酸多奈哌齐治疗血管性痴呆伴发抑郁疗效观察[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(7):1724-1726.
- [18] 段富津. 方剂学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1995:59.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:103.
- [20] NISHIO K, IHARA M, YAMASAKI N et al. A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy [J]. *Stroke*, 2010, 41(6):1278-1284.
- [21] CUMMINGS J L. Depression in vascular dementia [J]. *Hillside J Clin Psychiatry*, 1988, 10(2):209-231.
- [22] BENNETT S, THOMAS A J. Depression and dementia: cause, consequence or coincidence? [J]. *Maturitas*, 2014, 79(2):184-190.
- [23] CASTILLA P, RUBY C, HABEYCH M E. Subtypes of depression among patients with Alzheimer's disease

- and other dementias [J]. *Alzheimers Dement*, 2010, 6 (1):63-69.
- [24] KRISHNAN V, HAN M H, GRAHAM D L, et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions [J]. *Cell*, 2007, 131(2):391-404.
- [25] SPELLMAN T, LISTON C. Toward circuit mechanisms of pathophysiology in depression [J]. *Am J Psychiatry*, 2020, 177(5):381-390.
- [26] TAN Z H, QIU J, ZHANG Y T, et al. Tetramethylpyrazine alleviates behavioral and psychological symptoms of dementia through facilitating hippocampal synaptic plasticity in rats with chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Front Neurosci*, 2021, 6, 15:646537.
- [27] MUIR J, LOPEZ J, BAGOT R C. Wiring the depressed brain: optogenetic and chemogenetic circuit interrogation in animal models of depression [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2019, 44:(6):1013-1026.
- [28] BAGOT R C, PARISE E M, PEÑA C J, et al. Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:7062.
- [29] MUIR J, TSE Y C, IYER E S, et al. Ventral hippocampal afferents to nucleus accumbens encode both latent vulnerability and stress-induced susceptibility [J]. *Biol Psychiatry*, 2020, 88 (11) : 843-854.
- [30] KOTTER M R, LI W W, ZHAO C, et al. Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(1):328-332.
- [31] PINTO M V, FERNANDES A. Microglial phagocytosis-rational but challenging therapeutic target in multiple sclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17) : 5960.
- [32] LAMPRON A, LAROCHELLE A, LAFLAMME N, et al. Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(4):481-495.
- [33] CHU T C, ZHANG Y P, TIAN Z S, et al. Dynamic response of microglia/macrophage polarization following demyelination in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16:(1):188.
- [34] RAWJI K S, MISHRA M K, MICHAELS N J, et al. Immunosenescence of microglia and macrophages: impact on the ageing central nervous system [J]. *Brain*, 2016, 139(Pt 3):653-661.
- [35] LEE J, HAMANAKA G, LO H, et al. Heterogeneity of microglia and their differential roles in white matter pathology [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25 (12) : 1290-1298.
- [36] ULLAND T K, COLONNA M. TREM2-a key player in microglial biology and Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(11):667-675.
- [37] KAWABORI M, KACIMI R, KAUPPINEN T, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) deficiency attenuates phagocytic activities of microglia and exacerbates ischemic damage in experimental stroke [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(8) : 3384-3396.
- [38] WU R L, XIANG P, XU P F, et al. TREM2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Brain*, 2017, 10(1):20.
- [39] SONG M, ZHANG J J, LI X J, et al. Effects of Xiaoyaosan on depressive-like behaviors in rats with chronic unpredictable mild stress through HPA axis induced astrocytic activities [J]. *Front Psychiatry*, 2020, doi:10.3389/fpsy.2020.545823.
- [40] YAN Z Y, JIAO H Y, DING X F, et al. Xiaoyaosan improves depressive-like behaviors in mice through regulating apelin-APJ system in hypothalamus [J]. *Molecules*, 2018, doi:10.3390/molecules23051073.

[责任编辑 周冰冰]