

# 百合地黄汤抑制NLRP3炎症小体激活改善焦虑性抑郁症 模型大鼠海马神经元损伤

赵洪庆<sup>1</sup>, 唐林<sup>2</sup>, 吴碧茹<sup>1</sup>, 孟盼<sup>1</sup>, 刘检<sup>2</sup>, 杨蕙<sup>2</sup>, 王宇红<sup>1\*</sup>,  
龙红萍<sup>2</sup>, 李春艳<sup>1</sup>, 徐仪昕<sup>1</sup>  
(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208;  
2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

**[摘要]** 目的:从NOD样受体热蛋白结构域3(NLRP3)炎症小体探讨经典名方百合地黄汤抗焦虑性抑郁症的作用机制。方法:50只SD大鼠随机分为正常组、模型组、文拉法辛组(13.5 mg·kg<sup>-1</sup>),百合地黄汤高、低剂量组(16,4 g·kg<sup>-1</sup>),每组10只。采用28 d慢性束缚应激(6 h)联合皮下注射皮质酮(30 mg·kg<sup>-1</sup>)的方法建立焦虑性抑郁症大鼠模型,并从造模第8天起各给药组分别灌胃给予相应药物,正常组和模型组给予等体积蒸馏水,连续给药21 d。采用高架十字迷宫评价大鼠焦虑行为,旷场实验评价抑郁行为,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清及海马匀浆液中炎症因子白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-18(IL-18)的含量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马NLRP3,凋亡相关斑点样蛋白(ASC),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)蛋白的相对表达量,苏木素-伊红(HE)染色观察海马组织病理形态,免疫荧光法检测NLRP3,ASC,Caspase-1的平均荧光强度,电镜观察神经元超微结构。结果:与正常组比较,模型组大鼠总穿臂次数(TE),进入高架十字迷宫开放臂比(OE%),开放臂停留时间比(OT%)及自主活动评分均显著降低( $P<0.01$ ),焦虑和抑郁样行为显著,血清及海马中IL-1 $\beta$ ,IL-6,IL-18含量显著升高( $P<0.01$ ),NLRP3,ASC,Caspase-1蛋白表达显著增加( $P<0.01$ ),NLRP3炎症小体激活,海马神经元明显损伤;与模型组比较,百合地黄汤高剂量组大鼠焦虑、抑郁行为均显著改善( $P<0.01$ ),血清及海马IL-1 $\beta$ ,IL-6,IL-18含量均明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),海马NLRP3,ASC,Caspase-1蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ),海马神经元损伤情况得以缓解。结论:百合地黄汤能够通过抑制NLRP3炎症小体的过度激活改善焦虑性抑郁症神经元损伤。

**[关键词]** 百合地黄汤; 焦虑性抑郁症; NOD样受体热蛋白结构域3(NLRP3); 炎症小体; 海马; 神经元

**[中图分类号]** R2-0;R33;R338 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)20-0007-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20212037

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210831.0843.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-08-31 11:55

## Baihe Dihuangtang Improves Hippocampal Neuron Damage in Anxious Depression Model Rats by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation

ZHAO Hong-qing<sup>1</sup>, TANG Lin<sup>2</sup>, WU Bi-ru<sup>1</sup>, MENG Pan<sup>1</sup>, LIU Jian<sup>2</sup>, YANG Hui<sup>2</sup>, WANG Yu-hong<sup>1\*</sup>,  
LONG Hong-ping<sup>2</sup>, LI Chun-yan<sup>1</sup>, XU Yi-xin<sup>1</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the anti-anxious depression mechanism of Baihe Dihuangtang from the NOD-like receptor thermal protein domain 3 (NLRP3) inflammasome. **Method:** Fifty SD rats were randomly divided into normal group, model group, venlafaxine group (13.5 mg·kg<sup>-1</sup>), Baihe Dihuangtang high

**[收稿日期]** 20210624(020)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09309026);国家自然科学基金项目(82104836);湖南省自然科学基金项目(2019JJ50428);湖南省优秀博士后创新人才项目(2020RC2060);长沙市杰出创新青年培养计划项目(kq2009018)

**[第一作者]** 赵洪庆,在读博士,助理研究员,从事焦虑性抑郁症的防治研究,Tel:0731-88458205,E-mail:516005398@qq.com

**[通信作者]** \*王宇红,博士,研究员,博士生导师,从事抑郁类疾病的防治研究,Tel:0731-88459549,E-mail:wyh107@126.com

and low dose group ( $16, 4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), with 10 rats in each group. Chronic restraint stress for 28 days (6 h) combined with subcutaneous injection of corticosterone ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) was used to establish induce an anxious depression model. From the 8th day of modeling, the rats in the normal group and the model group received distilled water, and those in groups with drug intervention were treated with corresponding drugs by gavage for 21 days. Elevated plus maze and open field test were used to evaluate the behavioral changes of rats. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum and hippocampal interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-18 (IL-18) levels. Western blot were used to detect the relative expression of hippocampal NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), and Caspase-1. The pathological changes of the hippocampus were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, the average fluorescence intensity of NLRP3, ASC, and Caspase-1 was detected by immunofluorescence. The ultrastructure of neurons was observed under electron microscopy. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed reduced total entries (TE), the ratio of open-arm entries (OE%), the ratio of open-arm times (OT%), and the autonomous activity score ( $P<0.01$ ), significant anxiety and depression-like behaviors, increased levels of IL- $1\beta$ , IL-6, and IL-18 in the serum and hippocampus ( $P<0.01$ ), elevated protein expression of NLRP3, ASC, and Caspase-1 ( $P<0.01$ ), activated NLRP3 inflammasomes, and injured hippocampal neurons. Compared with the model group, the high-dose Baihe Dihuangtang group showed improved anxiety and depression-like behaviors ( $P<0.01$ ), and decreased levels of IL- $1\beta$ , IL-6, and IL-18 in the serum and hippocampus ( $P<0.05, P<0.01$ ), reduced protein expression of NLRP3, ASC, and Caspase-1 ( $P<0.01$ ), and alleviated hippocampal neuron damage. Conclusion: Baihe Dihuangtang can improve neuronal damage in anxious depression by inhibiting the excessive activation of NLRP3 inflammasomes.

**[Keywords]** Baihe Dihuangtang; anxiety depression; NOD-like receptor thermal protein domain 3 (NLRP3); inflammasome; hippocampus; neurons

焦虑性抑郁症是一种伴随着显著焦虑情绪的抑郁症,在抑郁症中占比超过40%<sup>[1]</sup>。该病兼具焦虑症和抑郁症的临床特征,而焦虑症状是导致抑郁症治疗阻碍最主要的影响因素之一<sup>[2]</sup>。目前,焦虑性抑郁症的病理机制主要涉及单胺神经递质失调、神经内分泌紊乱、突触稳态失衡等方面,尚缺乏深入的分子机制研究。近年来,免疫炎症在神经精神疾病病程演进中所扮演的角色受到广泛关注,机体免疫功能紊乱所引起的中枢炎症反应会损伤神经元,导致神经元的结构功能发生改变。NOD样受体热蛋白结构域3(NLRP3)炎症小体主要存在于固有免疫细胞、巨噬细胞、树突状细胞及中枢的小胶质细胞中,被认为是潜在的抑郁症炎症标志物之一<sup>[3]</sup>。NLRP3炎症小体是由NLRP3,凋亡相关微粒蛋白(ASC)及半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)组成的复合体,其激活后会诱导小胶质细胞合成并释放炎症因子,诱发中枢神经炎症反应,导致脑内神经递质改变以及抑郁症状的出现<sup>[4]</sup>。

百合地黄汤由百合、生地黄两味药物组成,具有养阴清热、宁心安神的功效,是张仲景《金匮要略》中治疗百合病的主要方剂,现代常作为基础方

用于治疗焦虑、抑郁、失眠等疾病<sup>[5]</sup>。百合地黄汤临床应用广泛、疗效确切、特色鲜明、安全性好,是国家中医药管理局制订的首批《古代经典名方目录》中的方剂,具有很强的开发价值。然而,目前该方的研究主要集中在标准煎液、质量控制、成分分析等药学或基础的药效学方面,较少涉及作用环节与,其能否通过调控免疫炎症发挥治疗疾病的作用未见报道。前期研究发现,百合地黄汤能够显著改善大鼠焦虑和抑郁样行为,缓解海马神经元损伤,其作用途径是否与抑制神经炎症有关,尚需实验证实。本研究以NLRP3炎症小体介导的中枢炎症为切入点,旨在深入阐明百合地黄汤治疗焦虑性抑郁症的增效机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级健康雄性SD大鼠50只,体质量180~200 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0004,饲养于湖南中医药大学实验动物中心,使用许可证号SYXK(湘)2019-0009,温度( $22\pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,湿度 $60\%\pm 5\%$ ,12 h明暗交替,适应性喂养3 d后开始实验。本实验经湖南中医药大学动物伦理委员会审查通过,审查号为

LLBH-202012040001。

**1.2 药物与试剂** 百合地黄汤由百合30 g, 生地黄30 g组成, 药材饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院, 经湖南中医药大学王宇红研究员鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》相关规定。参照百合地黄汤标准煎液方法<sup>[6]</sup>, 百合与生地黄分别进行水提, 称取药材放入提取罐中, 首先加入10倍体积水, 浸泡30 min, 武火煮沸后文火继续煎煮1~1.5 h, 获得水煎液, 继续加入6倍体积水进行煎煮, 合并2次水煎液, 浓缩, 分别制得百合煎液和地黄煎液, 合并, 浓缩至含生药量 $1.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。盐酸文拉法辛胶囊(成都康弘药业, 批号180912); 皮质酮(北京索莱宝科技有限公司, 批号YZ-100227); 大鼠白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), 白细胞介素-6(IL-6), 白细胞介素-18(IL-18)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(杭州联科生物技术有限公司, 批号分别为70-EK301B/3, 70-EK306/3, 70-EK218); 苏木素-伊红(HE)染色液, 电镜固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号分别为G1003, G1102); NLRP3一抗(英国Abcam公司, 批号ab254349); ASC一抗, Caspase-1一抗(美国Proteintech公司, 批号分别为10500-1-AP, 22915-1-AP)。

**1.3 仪器** PM-200型大鼠高架十字迷宫(成都泰盟软件有限公司); SMART 3.0动物行为学视频分析系统(西班牙Panlab公司); MK3型酶标仪(美国Thermo公司); YD-A型生物组织摊片机(金华市益迪医疗设备有限公司); HT7800型透射电子显微镜(日本Hitachi公司); Primo Vert型光学显微镜(德国Leica公司); ChemiDoc XRS+型凝胶成像分析仪(美国Bio-Rad公司); Axio Scan.Z1型全自动数字玻片扫描系统(德国Zeiss公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组、造模及给药** 将50只大鼠随机分为正常组, 模型组, 文拉法辛组, 百合地黄汤高、低剂量组, 每组10只。除正常组外, 其余组均参考文献[7-8]采用皮质酮注射联合束缚应激的方法建立焦虑性抑郁症大鼠模型, 大鼠每天接受6 h束缚应激, 同时于颈背部皮下注射皮质酮 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 连续造模28 d, 通过行为学指标观测判定造模成功<sup>[9]</sup>。于大鼠造模第8天开始灌胃给药, 文拉法辛组给予文拉法辛胶囊 $13.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (临床等效2倍剂量), 百合地黄汤高、低剂量组根据前期预实验结果分别给予百合地黄汤水煎液 $16, 4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 正常组和模型组均采用等体积蒸馏水灌胃,  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 每

天给药1次, 连续21 d。给药完成后, 进行行为学测试, 麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 一部分经心脏先后灌注生理盐水和多聚甲醛, 待动物全身僵硬后分离脑组织保存于10%甲醛溶液中, 一部分直接在冰上分离海马组织, 于液氮中速冻, 转移至 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。

**2.2 行为学检测** 高架十字迷宫实验: 记录5 min内大鼠分别进入高架十字迷宫开放臂、封闭臂的次数及在开放臂的停留时间, 计算总穿臂次数(TE), 进入开放臂的比例(OE%)及开放臂停留时间比例(OT%)。旷场实验: 大鼠在旷场箱中自由活动30 s后, 记录4 min内的水平跨格次数及垂直活动次数, 以两者之和表示其自主活动评分。

**2.3 ELISA检测大鼠血清及海马炎症因子的表达** 制备大鼠海马组织匀浆液, 采用ELISA试剂盒检测血清及海马匀浆液中炎症因子IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18的含量, 操作过程按照试剂盒说明书进行。

**2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白表达水平** 制备分离胶与浓缩胶, 每孔加入蛋白 $30 \mu\text{g}$ , 80 V恒压电泳, 转膜后5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 洗膜后加入稀释后的一抗(1:1 000),  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。后加入二抗(1:2 000), 室温下孵育2 h, 采用化学发光法显影, 采用Image J软件测量各条带灰度值, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参, 计算目的蛋白的相对表达量, 进行统计学分析。

**2.5 HE染色观察海马组织一般病理形态** 取大鼠脑组织梯度脱水、透明、石蜡包埋、切片、脱蜡, 行HE染色, 将染色后的切片脱水透明, 封片, 于光学显微镜下观察海马组织病理变化。

**2.6 免疫荧光法检测海马区NLRP3, ASC, Caspase-1表达** 取大鼠脑组织脱水, OCT包埋, 冰冻切片, 片厚 $10 \mu\text{m}$ 。切片加Tris缓冲液室温浸泡30 min, TBS液漂洗2次; 山羊血清封闭1 h后, 加稀释后的一抗(1:500),  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 漂洗2次, 滴加荧光二抗(1:200), 室温避光孵育2 h; 漂洗3次, 滴加抗荧光淬灭剂进行封片。采用全自动数字玻片扫描仪进行扫描, 选取海马区3个视野, 应用Image J软件分析计算平均荧光强度。

**2.7 电镜观察海马神经元超微结构** 将海马组织切成 $1 \text{ mm}^3$ 小块, 先后于2.5%戊二醛和1%锇酸中充分固定, 脱水, 包埋, 超薄切片, 片厚50 nm, 醋酸铀、枸橼酸铅双重染色后置于铜载网上, 电子显微镜下观察神经元超微结构变化。

**2.8 统计学处理** 采用SPSS 19.0软件对数据进行统计,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用SNK法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 对大鼠行为学的影响 与正常组比较,模型组

大鼠TE,OE%,OT%及自主活动评分均显著降低( $P < 0.01$ ),提示其具有明显的焦虑和抑郁样特征;与模型组比较,文拉法辛组及百合地黄汤高剂量组TE,OE%,OT%,自主活动评分均明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),百合地黄汤低剂量组大鼠自主活动评分明显升高( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 百合地黄汤对焦虑性抑郁大鼠行为学的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of Baihe Dihuangtang on behavior of rats with anxious depression ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TE/次	OE%	OT%	自主活动评分/次
正常		12.40±3.10	40.31±5.49	23.94±4.24	53.30±10.42
模型		7.20±2.30 <sup>1)</sup>	32.62±5.92 <sup>1)</sup>	16.16±2.87 <sup>1)</sup>	31.78±7.16 <sup>1)</sup>
文拉法辛	0.013 5	10.56±2.19 <sup>3)</sup>	37.38±5.78 <sup>2)</sup>	20.27±3.44 <sup>2)</sup>	43.90±7.08 <sup>3)</sup>
百合地黄汤	16	10.60±2.68 <sup>3)</sup>	39.73±3.08 <sup>3)</sup>	21.70±4.89 <sup>3)</sup>	44.50±9.54 <sup>3)</sup>
	4	9.11±1.62	36.77±4.86	17.35±3.66	39.78±7.17 <sup>2)</sup>

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

**3.2 对大鼠血清及海马炎症因子的影响** 与正常组比较,模型组大鼠血清及海马匀浆液中炎症因子IL-1 $\beta$ ,IL-6,IL-18含量均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,文拉法辛组与百合地黄汤高剂量组大鼠血

清及海马组织IL-1 $\beta$ ,IL-6,IL-18含量均明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且百合地黄汤在调控血清IL-1 $\beta$ 和海马IL-18方面效果更明显。见表2。

表2 百合地黄汤对焦虑性抑郁大鼠血清及海马炎症因子的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of Baihe Dihuangtang on serum and hippocampal inflammatory factors in rats with anxious depression ( $\bar{x} \pm s, n=6$ ) ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	血清			海马		
		IL-1 $\beta$	IL-6	IL-18	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-18
正常		118.8±11.3	187.3±21.7	49.0±11.3	84.9±7.4	101.7±9.5	40.1±7.8
模型		157.8±17.5 <sup>1)</sup>	227.9±13.0 <sup>1)</sup>	81.4±10.7 <sup>1)</sup>	107.7±11.2 <sup>1)</sup>	135.3±11.8 <sup>1)</sup>	59.0±5.8 <sup>1)</sup>
文拉法辛	0.013 5	130.4±12.2 <sup>2)</sup>	196.1±19.6 <sup>2)</sup>	58.2±5.7 <sup>3)</sup>	92.8±7.4 <sup>2)</sup>	119.1±12.3 <sup>2)</sup>	48.2±5.5 <sup>2)</sup>
百合地黄汤	16	123.1±8.4 <sup>3)</sup>	202.1±18.1 <sup>2)</sup>	57.4±7.9 <sup>3)</sup>	91.1±12.6 <sup>2)</sup>	116.3±8.0 <sup>2)</sup>	45.5±4.4 <sup>3)</sup>
	4	140.6±15.4	212.5±8.9	75.9±6.6	100.5±5.2	125.3±9.3	52.8±6.8

**3.3 对大鼠海马NLRP3,ASC,Caspase-1蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠海马NLRP3,ASC,Caspase-1蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ );经文拉法辛或高剂量百合地黄汤干预治疗后,模型大鼠

NLRP3,ASC,Caspase-1蛋白表达均显著降低( $P < 0.01$ ),低剂量百合地黄汤则能够明显降低Caspase-1的表达,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表3,图1。

表3 百合地黄汤对焦虑性抑郁大鼠海马NLRP3,ASC,Caspase-1蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of Baihe Dihuangtang on expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 protein in hippocampus of rats with anxious depression ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NLRP3/GAPDH	ASC/GAPDH	Caspase-1/GAPDH
正常		0.347±0.049	0.087±0.012	0.517±0.050
模型		0.979±0.114 <sup>1)</sup>	0.299±0.032 <sup>1)</sup>	0.837±0.094 <sup>1)</sup>
文拉法辛	0.013 5	0.643±0.058 <sup>3)</sup>	0.147±0.021 <sup>3)</sup>	0.629±0.061 <sup>3)</sup>
百合地黄汤	16	0.602±0.065 <sup>3)</sup>	0.138±0.017 <sup>3)</sup>	0.624±0.048 <sup>3)</sup>
	4	0.866±0.092	0.247±0.041	0.705±0.066 <sup>2)</sup>

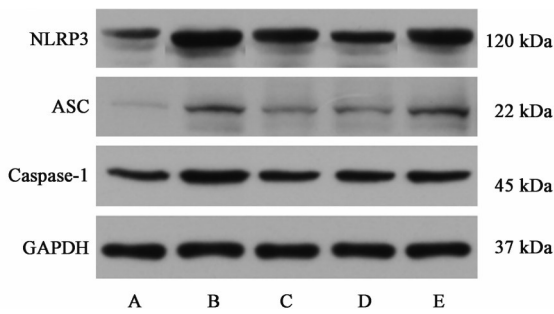


图1 各组大鼠海马NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of NLRP3, ASC and Caspase-1 protein expression in hippocampus of each group of rats

### 3.4 对大鼠海马病理形态的影响 正常组大鼠海

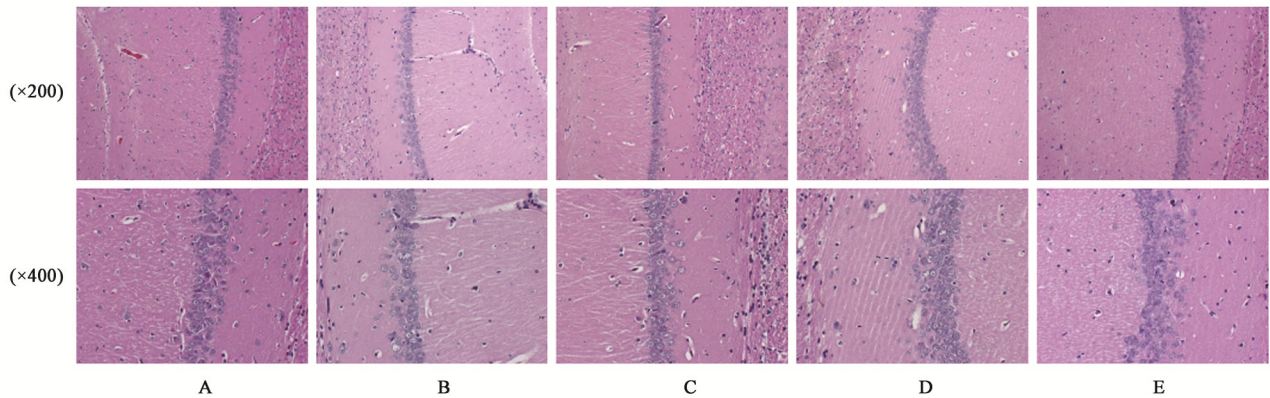


图2 百合地黄汤对焦虑性抑郁大鼠组织病理形态的影响(HE)

Fig. 2 Effect of Baihe Dihuangtang on histopathological morphology in rats with anxious depression (HE)

3.6 对大鼠神经元超微结构的影响 正常组大鼠神经元细胞器丰富,内质网分布均匀,线粒体形态正常,核膜结构清晰,染色质均匀;模型组部分细胞器缺损,胞核皱缩,内质网扩张,线粒体肿胀,整体损伤较为明显;文拉法辛组和百合地黄汤高剂量组神经元各细胞器结构基本保持正常,损伤明显减轻;百合地黄汤低剂量组神经元存在核仁皱缩,内质网扩张等超微结构损伤。见图4。

## 4 讨论

焦虑性抑郁症属于中医情志病范畴,古代虽无该病名记载,但其类似症状可追溯到东汉张仲景《金匮要略》中的“百合病”,是一种心肺阴虚内热的疾病,以神志恍惚、沉默寡言、情绪怪异、饮食行动失常为表现特征。百合地黄汤是张仲景治疗百合病的主方,方中百合清心安神、滋补精血,生地黄清热生津、滋阴凉血,百合偏于补,清润而不腻,生地黄偏于泻,泻热而不燥,且二者均味甘性微寒,入心经,相合而用,使心肺烦躁之热得清,脑神得安,阴

马神经元排列规则,分布均匀,胞体无空泡现象;模型组部分区域神经元散乱,胞体呈空泡状,可见神经元碎片,密度有一定程度下降;文拉法辛组和百合地黄汤高剂量组损伤现象明显好转,神经元排列规则整齐,数量增加;低剂量组神经元密度较模型组增加,仍可见细胞空泡化及细胞碎片。见图2。

3.5 对大鼠海马NLRP3, ASC, Caspase-1荧光表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠海马NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白的平均荧光强度值显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,百合地黄汤高剂量组NLRP3, ASC, Caspase-1的荧光强度值显著降低( $P<0.01$ ),低剂量组ASC和Caspase-1的表达明显降低( $P<0.05$ )。见图3,表4。

阳得平<sup>[10]</sup>。现代药理研究表明,百合水煎液能够改善慢性不可预见性应激小鼠的抑郁行为,并升高脑内5-羟色胺(5-HT)水平<sup>[11]</sup>,其活性成分是百合总皂苷;生地黄提取物能够降低小鼠的悬尾不动时间和强迫游泳不动时间,增加自主活动次数<sup>[12]</sup>,并有保护海马神经元,促进神经再生的功效<sup>[13]</sup>,其活性成分是梓醇。大量临床研究表明,百合地黄汤加减治疗原发性抑郁症和继发性抑郁症都有显著的疗效,能够改善患者焦虑抑郁状态,降低汉密尔顿焦虑量表(HAMD)和汉密尔顿抑郁量表(HAMA)评分值,对于失眠症状也有明显的治疗作用<sup>[14-16]</sup>。

近年来抑郁症的免疫炎症学说备受国内外关注,NLRP3炎症小体是潜在的抗抑郁靶点。正常情况下,免疫细胞未受到刺激,ASC位于细胞核内,而在持续的应激状态下,免疫细胞被激活,使ASC由胞核移位到胞浆,与诱导NLRP3炎症小体的热蛋白结构域结合,通过招募Caspase-1前体蛋白进行自切割,产生活化的Caspase-1<sup>[17]</sup>。活化的Caspase-1是

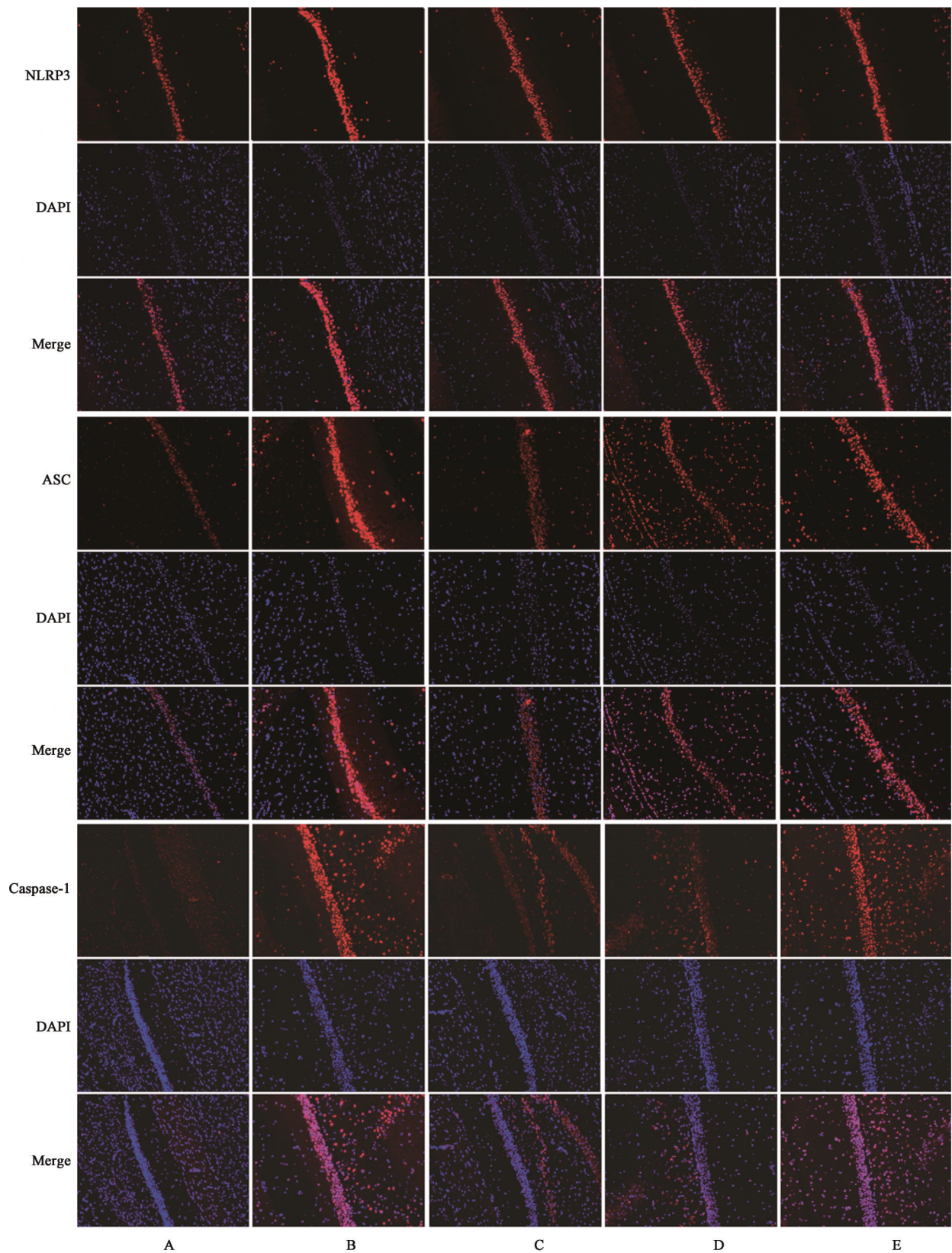


图3 各组大鼠海马NLRP3,ASC,Caspase-1荧光表达情况(免疫荧光,×200)

Fig. 3 Fluorescence expression of NLRP3,ASC and Caspase-1 in hippocampus of rats in each group (IF,×200)

介导炎症反应的执行蛋白,能够将不成熟的白细胞介素-1 $\beta$ 前体(pro-IL-1 $\beta$ )和白细胞介素-18前体

(pro-IL-18)剪切成活化状态并释放到胞外,IL-1 $\beta$ 和IL-18的释放会继续激活炎症相关通路,如核转录因

表 4 百合地黄汤对焦虑性抑郁大鼠海马区 NLRP3, ASC, Caspase-1 平均荧光强度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of Baihe Dihuangtang on average fluorescence intensity of NLRP3, ASC and Caspase-1 in hippocampus of rats with anxious depression ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NLRP3	ASC	Caspase-1
正常		1.452±0.177	0.737±0.056	0.619±0.076
模型		2.781±0.325 <sup>1)</sup>	1.872±0.139 <sup>1)</sup>	2.145±0.184 <sup>1)</sup>
文拉法辛	0.013 5	1.995±0.204 <sup>3)</sup>	1.024±0.152 <sup>3)</sup>	1.019±0.163 <sup>3)</sup>
百合地黄汤	16	1.752±0.145 <sup>3)</sup>	1.188±0.127 <sup>3)</sup>	0.874±0.069 <sup>3)</sup>
	4	2.141±0.252	1.421±0.133 <sup>2)</sup>	1.515±0.120 <sup>2)</sup>

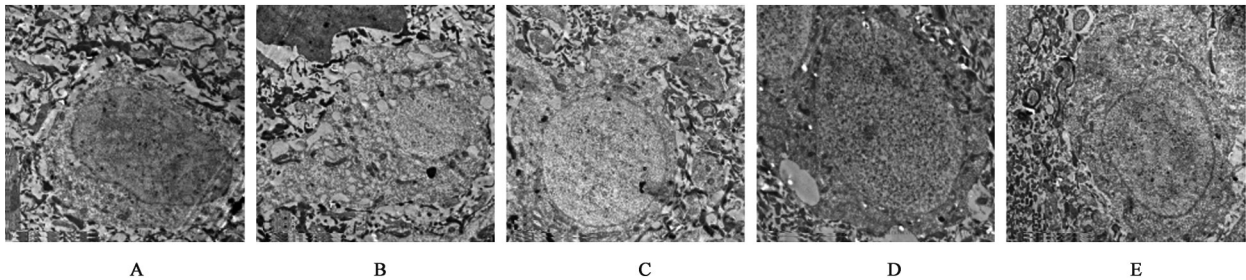


图 4 百合地黄汤对焦虑性抑郁大鼠神经元超微结构的影响(透射电镜, ×25 000)

Fig. 4 Effect of Baihe Dihuangtang on ultrastructure of neuron in rats with anxious depression (TEM, ×25 000)

子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B), 导致更多炎症因子的产生, 引发炎症反应<sup>[18]</sup>。炎症反应的发生又会进一步激活 NLRP3 炎症小体, 如此循环反复, 介导细胞凋亡或焦亡, 诱发疾病。研究表明, 抑郁状态下海马 NLRP3 炎症小体过度表达呈激活态<sup>[19]</sup>; 而敲除 NLRP3 基因的小鼠, 即使给予慢性不可预见性应激, 也并不表现出抑郁样行为<sup>[20]</sup>。本研究定位-定量探讨了 NLRP3 小体的表达, 发现焦虑性抑郁症大鼠海马 NLRP3, ASC, Caspase-1 表达显著增加, 同时血液与海马组织中炎症因子 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 含量均升高, 说明 NLRP3 炎症小体激活, 进而启动炎症反应, 诱导外周及中枢炎症因子的产生; 给予百合地黄汤干预后, 模型大鼠 NLRP3 小体激活态得以抑制, 这可能与其对海马神经元的保护作用有关。

综上, 百合地黄汤能够改善焦虑性抑郁症模型大鼠海马神经元损伤, 发挥抗焦虑抑郁功效, 其机制与抑制 NLRP3 炎症小体的过度激活, 降低外周与中枢炎症水平有关。本研究阐明了百合地黄汤治疗焦虑性抑郁症的潜在机制, 有助于该方进一步的开发与应用, 课题组下一步拟结合失眠模型继续挖掘其功效作用及潜在靶点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SEMKOVSKA M, QUINLIVAN L, O'GRADY T, et

al. Cognitive function following a major depressive episode: a systematic review and Meta-analysis [J]. Lancet Psychiatry, 2019, 6(10): 851-861.

[2] PAUL H, MICHAEL C, CHRISTIAN E, et al. Distinctive and common neural underpinnings of major depression, social anxiety, and their comorbidity [J]. Soc Cogn Affect Neurosci, 2015, 10(4): 552-560.

[3] 张昕洋, 陈志刚, 刘雪梅, 等. 中医药干预 NLRP3 炎症小体治疗脑梗死的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2602-2608.

[4] LI D X, WANG C N, WANG Y, et al. NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis and apoptosis in hippocampus neurons mediates depressive-like behavior in diabetic mice [J]. Behav Brain Res, 2020, 391: 112684.

[5] 姜晓娜, 陈聪, 王欣, 等. 百合地黄汤研究述要 [J]. 长春中医药大学学报, 2019, 35(5): 987-990.

[6] 周菲, 林美斯, 王琳, 等. 经典名方百合地黄汤物质基准制备及过程质量控制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3824-3832.

[7] 赵洪庆. 焦虑性抑郁动物模型及其多层次评价体系的建立 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.

[8] 崔妍, 王若男, 吴九如, 等. 酸枣仁和合欢花水提取物对焦虑性抑郁症模型大鼠 HPA 轴及炎症因子的影响 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2019, 45(3): 539-545.

[9] 赵洪庆, 刘检, 孟盼, 等. 百合地黄汤对焦虑性抑郁症模型大鼠海马突触可塑性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(10): 2015-2020.

- 志, 2021, 46(5): 240-245.
- [10] 陈碧芳. 百合病病证治方的理论探讨[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [11] 尹玲珑, 彭察安, 张宜, 等. 道地药材湘西龙山百合对慢性应激抑郁模型小鼠脑内5-HT表达影响的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(2): 357-358.
- [12] 王君明, 冯卫生, 崔瑛, 等. 地黄醇提物及其药渣水提物抗抑郁作用的比较研究[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(23): 2073-2076.
- [13] 张颖, 陈宇霞, 黄世敬. 生地抗抑郁研究现状[J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(2): 275-277.
- [14] 杨蒙蒙, 张怀亮. 百合地黄汤治疗脑卒中后抑郁症的疗效探讨[J]. 中国现代药物应用, 2020, 14(20): 213-215.
- [15] 诸葛叶婷. 加味百合地黄汤对干燥综合征焦虑抑郁状态患者P2X7R炎性通路干预作用研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [16] 张忠, 于翔, 李子全, 等. 百合地黄汤治疗阴虚火旺型失眠临床观察[J]. 光明中医, 2014, 34(10): 1509-1511.
- [17] 王小燕, 谭子虎, 喻小明, 等. 基于Nlrp3/ASC/Caspase-1通路探讨加减薯蕷丸对APP/PS1痴呆小鼠神经炎症的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(3): 8-14.
- [18] MATTHEW S J, EDWARD J O, WILLIAM R R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(8): 588-606.
- [19] FERNANDA N K, PAULA C, GABRIELE G, et al. NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: clinical and preclinical findings [J]. Brain Behav Immun, 2017, 64(8): 367-383.
- [20] ELISABET A G, CRISTINA U M, FABIOLA M A, et al. Stress-induced depressive behaviors require a functional NLRP3 inflammasome [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(7): 4874-4882.

[责任编辑 孙丛丛]