

· 配伍 ·

温阳、解郁及温阳解郁方对LPS“二次应激”诱发的抑郁样行为小鼠海马小胶质细胞的影响

巩子汉¹, 高静静^{2*}, 余楷杰¹, 张欢润¹, 左阳³, 杨婧雯¹, 梁媛¹, 岳广欣^{1*}

(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, 北京 100029)

[摘要] 目的:观察母婴分离(MS)联合脂多糖(LPS)应激后抑郁样行为小鼠海马区小胶质细胞活化及炎症因子的表达情况,从温阳、解郁及温阳解郁二方合用的角度探讨温阳解郁法抗抑郁的可能机制。方法:将70只仔鼠随机分为正常组(10只)、LPS应激组(LPS, 10只)和造模组(MS, 50只),造模组小鼠在产后第5天(PD₅)-PD₁₄进行8 h·d⁻¹的母婴分离,后将造模组分为母婴分离+脂多糖应激组(MS+LPS),温阳组(WY),解郁组(JY),温阳解郁组(WYJY)及氟西汀组(FLU),每组10只。将仔鼠出生日期记为PD₀,正常,LPS及MS+LPS组小鼠于PD₂₁-PD₉₀饲喂正常饲料,其余各组给予对应的药混饲料喂养,且于PD₉₁给予脂多糖腹腔注射7 d,建立抑郁症小鼠模型。采用旷场, O迷宫和社会交互实验检测各组小鼠抑郁样行为;免疫组化法观察海马组织小胶质细胞钙结合蛋白-1(Iba-1)蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应法检测白细胞介素-1β(IL-1β),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子-α(TNF-α), Iba-1及糖皮质激素受体(GR) mRNA表达量。结果:与正常组比较,LPS组小鼠5 min中心区停留时间有减少趋势、运动总路程显著减少($P<0.01$),活动总路程显著减少($P<0.01$),MS+LPS组小鼠开放臂活动时间及活动总路程明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),训练、辨别探查时间显著升高($P<0.01$),LPS,MS+LPS组小鼠海马CA1区Iba-1表达显著升高($P<0.01$);与LPS组比较,MS+LPS组小鼠5 min运动总路程明显增长($P<0.05$),训练、辨别探查时间明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),海马CA1区Iba-1表达显著升高($P<0.01$);与MS+LPS组比较,各给药组小鼠5 min运动总路程均明显减少($P<0.01$),训练探查时间均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),JY,WYJY,FLU组小鼠辨别探查时间均显著降低($P<0.01$),各给药组小鼠海马CA1区Iba-1表达显著降低($P<0.01$)。结论:温阳解郁法可能通过抑制抑郁症小鼠海马区小胶质细胞的激活,降低IL-1β,IL-6,TNF-α等炎症因子的表达,进而抑制抑郁症发生及发展。

[关键词] 母婴分离; 脂多糖(LPS); 温阳解郁; 小胶质细胞; 海马

[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)21-0055-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212001

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210831.1122.003.html>

[网络出版日期] 2021-08-31 15:35

Effect of Wenyang, Jieyu, and Wenyang Jieyu Prescriptions on Hippocampal Microglia of Mice with Depression-Like Behavior Induced by Secondary LPS Exposure

GONG Zi-han¹, GAO Jing-jing^{2*}, SHE Kai-jie¹, ZHANG Huan-run¹, ZUO Yang³, LIANG Jing-wen¹,
LIANG Yuan¹, YUE Guang-xin^{1*}

(1. Institute of Basic Theories of Traditional Chinese Medicine (TCM), China Academy of

Chinese Medical Sciences, Beijing 100700; 2. Kaifeng Hospital of TCM, Kaifeng 475000;

3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

[收稿日期] 20210609(014)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573846,81072730);中国中医科学院中医基础理论研究所基本科研业务费自主选题项目(YZ202107);中国中医科学科技创新工程重大攻关项目(CI2021A00607)

[第一作者] 巩子汉,在读博士,从事中医脾胃病及中医药方证相关基础研究,E-mail:1217253647@qq.com

[通信作者] *高静静,硕士,主治医师,从事心身医学研究,E-mail:578194396qq.com;

*岳广欣,博士,研究员,博士生导师,从事中医方证及精神行为病症的中医病理生理基础及防治研究,E-mail:yuegx73@hotmail.com

[Abstract] objective: To observe the activation of microglia and the expression of inflammatory factors in hippocampus of mice with depression-like behavior after mother-infant separation (MS) combined with lipopolysaccharide (LPS) stress, and to explore the possible anti-depression mechanisms of Wenyang (WY), Jieyu (JY), and Wenyang Jieyu (WYJY) prescriptions from the perspective of warming Yang and relieving depression. **Method:** Seventy offspring mice were randomly divided into a normal group ($n=10$), a LPS stress group ($n=10$), and a modeling group ($n=50$). After undergoing $8\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ mother-infant separation during postnatal day 5 (PD₅) - PD₁₄, mice in the modeling group were further divided into the MS + LPS group, WY group, JY group, WYJY group, and fluoxetine (FLU) group, with 10 in each group. The birth date of the offspring mice was recorded as PD₀. The mice in the normal, LPS, and MS + LPS groups were fed a normal diet during PD₂₁ - PD₉₀, while those in the other groups were treated with the mixtures of corresponding drugs and feed, followed by seven-day intraperitoneal injection of LPS since PD₉₁ for inducing depression. The depression-like behavior of mice in each group was detected in the open-field, O-maze, and social interaction tests. The protein expression of microglia-specific ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1) in the hippocampus was assayed by immunohistochemistry, and the mRNA expression of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), Iba-1, and glucocorticoid receptor (GR) by real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR). **Result:** Compared with the normal group, the LPS group exhibited significantly reduced residence time at the central area within 5 min ($P<0.01$) and shortened total exercise distance ($P<0.01$). In the MS + LPS group, the open-arm activity time and the total activity distance decreased significantly ($P<0.01$, $P<0.05$), whereas the training, discrimination and exploration time increased significantly ($P<0.01$). The expression of Iba-1 in hippocampal CA1 region of mice in the LPS and MS + LPS groups was remarkably elevated ($P<0.01$). Compared with the LPS group, the MS + LPS group displayed significantly prolonged distance of 5-min exercise ($P<0.05$), increased training, discrimination and exploration time ($P<0.05$, $P<0.01$), and up-regulated Iba-1 expression in hippocampal CA1 area ($P<0.01$). As revealed by comparison with the MS + LPS group, both the total 5-min exercise distance ($P<0.01$) and the training and discrimination time ($P<0.01$, $P<0.05$) of mice in each administration group was significantly shortened. The discrimination and exploration time of mice in the JY, WYJY, and FLU groups was significantly reduced ($P<0.01$), and the expression of Iba-1 in hippocampal CA1 region of mice in each administration group was significantly down-regulated ($P<0.01$). **Conclusion:** The warming Yang and relieving depression method helps to inhibit the occurrence and development of depression due to its efficacy in activating microglia in hippocampus of depression mice and lowering the expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α .

[Keywords] mother-infant separation (MS); lipopolysaccharide (LPS); warming Yang and relieving depression; microglia; hippocampus

抑郁症作为一种常见、难治的精神类疾病,主要以情绪低落,兴趣降低,睡眠障碍,烦躁感,失去自我,甚者自杀等为主要表现,已然成为重大的社会问题。据统计全世界约有3.5亿人罹患抑郁症,我国抑郁症的患病率约为7%,且呈逐年上升的趋势^[1]。抑郁症的发病机制复杂,主要有单胺类神经递质假说、脑源性神经营养因子假说、下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)假说及免疫炎症假说等^[2-5]。近年来随着对抑郁症的深入研究,免疫炎症假说^[6-7]受到诸多研究者的关注,认为免疫系统激活进而导致细胞因子过度分泌,为诱导抑郁症发生的可能机制。

早年不良经历如幼年创伤、母婴分离等对机体造成的不良影响,可经由复杂的分子和细胞机制,以表观遗传、神经可塑性及HPA功能等改变而延续,影响相关脑区结构和功能的正常发育^[8],增加了个体成年后罹患如抑郁症等精神类疾病的风险^[9]。研究表明母婴分离小鼠被动接受“二次打击”时其焦虑及抑郁样行为表现明显^[10],同时伴有较强的中枢炎症反应,以小胶质细胞激活、炎症因子分泌失衡等为特征表现,严重影响其神经发生及认知功能^[11],因此神经炎症可能是抑郁症发病的重要机制之一。逍遥散出自《太平惠民和剂局方》,由柴胡、

当归、白芍、白术、茯苓、生姜、薄荷、炙甘草组成,具有疏肝解郁、养血健脾之功;二仙汤出自上海中医药大学《中医方剂临床手册》,由仙茅、淫羊藿、巴戟天、当归、知母、黄柏组成,具有温肾阳、补肾精之功;对于抑郁症的治疗有从肝郁论治者,亦有从肾阳虚论治者,且均有较好的疗效,但鲜有从肝郁肾虚论治者。故本研究采用注射脂多糖作为二次应激因素,观察母婴分离(MS)小鼠在脂多糖应激后的抑郁样行为及其对小胶质细胞的变化,探讨温阳、解郁及温阳解郁方对二次应激后小鼠抑郁样行为及其小胶质细胞的调节作用,以期从温肾阳和解肝郁角度为遭受早年不良经历后所致抑郁症的早期防治提供临床治疗思路。

1 材料

1.1 动物 选用2月龄,体质量为(22±2) g的C57BL/6J小鼠进行繁殖,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。于中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验中心常规适应性饲养。相对湿度45%~55%,室温22~25℃,自由饮水进食。实验动物处理遵守中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会的伦理要求。将小鼠按雌-雄4:1的比例进行混居,孕鼠产前单笼饲养。

1.2 药物及试剂 中药饮片:仙茅、淫羊藿、巴戟天、当归、知母、黄柏、柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、生姜、薄荷、炙甘草,购自北京仟草中药饮片公司(批号分别为180314005, 181008006, 180823017, 181109008, 181017004, 180601013, 170211003, 180824003, 181016010, 181101013, 180720012, 180524007, 181022005, 181019024),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;盐酸氟西汀胶囊(礼来苏州制药有限公司,货号20160029);免疫球蛋白(Ig)G/生物素标记,ABC工作液,冰冻切片包埋剂及抗体稀释液(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号分别为ZB-2050, PK-6100, ZLI-9302, 2LI-9029);Iba-1抗体(英国Abcam公司,货号ab178846);SV Total RNA Isolation System, GoTaq® 2-Step实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) System[普洛麦格(北京)生物技术有限公司,货号分别为Z3100, A6010];TRIzol(美国Ambion公司,批号152104)。

1.3 仪器 3K15型高速低温离心机(美国Sigma公司);Elx800型酶标仪(美国BioTek公司);Pro200型电动匀浆器(美国PRO Scientific公司);AR2130型

分析天平(美国OHAUS公司);Ettan DIGE型荧光扫描分析仪(美国GE公司);N-800F型荧光显微镜(中国宁波永新光学股份有限公司);CFX96™ Optics Module型Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司);自制旷场箱(40 cm×40 cm×35 cm);O迷宫(上海欣软信息科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与模型制备 将70只仔鼠随机分为正常(10只)、脂多糖(LPS, 10只)和造模(MS, 50只),MS后将其分为母婴分离+脂多糖组(MS+LPS),温阳组,解郁组,温阳解郁组及氟西汀组,每组10只。

抑郁症模型制备^[12-13]:采用MS+LPS复制抑郁症模型,将仔鼠出生日记为PD₀,于PD₅-PD₁₄进行母婴分离,先将母鼠移至新笼,再将仔鼠移至孵育箱(32℃, 8 h·d⁻¹),正常组及LPS组操作同上(10 min·d⁻¹),共10 d,后继续饲养至PD₂₀。PD₂₁-PD₉₀,正常组仔鼠以正常饲料喂养,其余各组仔鼠则以对应的药混饲料,且于PD₉₁给予LPS(5 mg·kg⁻¹)腹腔注射1次,正常组小鼠给予腹腔注射等量生理盐水,PD₉₈进行旷场实验,O迷宫实验及社会交互认知实验评价造模成功与否^[13],之后取材。

2.2 药物制备及给药方法 依据《太平惠民和剂局方》及上海中医药大学《中医方剂临床手册》确定逍遥散、二仙汤的药物组成及用量:逍遥散(柴胡15 g,当归15 g,白芍15 g,白术15 g,茯苓15 g,生姜5 g,薄荷5 g,炙甘草7.5 g),二仙汤(仙茅9 g,淫羊藿9 g,巴戟天9 g,当归9 g,知母4.5 g,黄柏4.5 g),温阳解郁方为二者合方。于上述药物中首次加入10倍量水浸泡30 min,武火煮开后文火煎煮1.5 h取滤液,药渣中再加入8倍量水,操作同上。将2次煎煮药汁合并,水浴浓缩并干燥,制成药粉于4℃冰箱中备用,其中逍遥散、二仙汤及温阳解郁方的出膏率分别为25.4%, 26.9%, 27.3%。按人(70 kg)与小鼠(20 g)体表面积折算,温阳组,解郁,温阳解郁组及FLU分别给予二仙汤、逍遥散、温阳解郁方及盐酸氟西汀药液,给药剂量分别为5.85, 12.03, 16.71 g·kg⁻¹, 2.60 mg·kg⁻¹,因本研究药物干预时间较长,故采用药混饲料进行药物干预,按成年小鼠的进食量为5 g·d⁻¹,药/饲料量为23.4, 48.12, 66.84 g·kg⁻¹, 10.4 mg·kg⁻¹,将药粉混合入饲料粉末中,加入适量纯净水压成条状,60℃烘干备用。

2.3 动物取材 各组小鼠行为学检测结束后,采用1%戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,处死取

脑,部分置于4%多聚甲醛固定液中待病检;部分于-80℃冰箱冻存备用以分子生物学检测。

2.4 指标检测

2.4.1 旷场实验 依次将小鼠放入旷场箱(40 cm×40 cm×35 cm)中心点,设中心点附近20 cm×20 cm区域为中央区,记录30 min小鼠运动总长度及中央区停留时间,结束后用70%乙醇擦拭旷场装置,采用Ethovision 3.0软件进行行为学数据分析。

2.4.2 O迷宫实验 将小鼠依次放入开放臂,头向闭合臂,观察5 min内小鼠的开放臂停留时间、闭合臂停留时间和活动总路程,结束后用70%乙醇擦拭旷场装置。O迷宫外径为65 cm,内径为60 cm,分开放臂和闭合臂,离地面60 cm,采用Ethovision3.0软件进行行为学数据分析。

2.4.3 社会交互认知实验 ①先将实验小鼠置于旷场箱中适应15 min。开始实验,将一只同种属同性别的小鼠放入6 cm×8 cm×10 cm的网笼中,然后将该网笼放置于40 cm×40 cm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10 cm的区域定义为接触区,随后记录前4 min内,实验鼠进入接触区的时间;②35 min后,于第1次的位置处放入实验鼠,接触同一只接触鼠,再次记录4 min内实验鼠进入接触区的时间;③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/两次探索时间之和即为辨别比率,采用Ethovision3.0软件进行行为学数据分析。

2.5 免疫组化法检测各组小鼠海马区小胶质细胞的形态及Iba-1的表达水平 将固定于4%多聚甲醛中的脑组织冰冻切片,按实验步骤进行操作,10%兔血清封闭1 h;一抗(Iba-1, 1:1 000)4℃过夜;磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3×10 min,二抗(兔抗山羊IgG, 1:200)室温孵育4 h, DAB显色15 min, PBS冲洗后贴片,梯度脱水并封片。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、形态及Iba-1表达情况。

2.6 Real-time PCR检测各组小鼠海马区GR, Iba-1, IL-1β, IL-6及TNF-α mRNA表达水平 采用TRIzol法提取各组小鼠海马组织总RNA,加入无核酸酶水30 μL溶解总RNA。使用核酸定量分析仪测定RNA浓度,且吸光度 A_{260}/A_{280} 在1.8~2.0。设置cDNA反转程序,PCR扩增糖皮质激素受体(GR), Iba-1, IL-1β, IL-6及TNF-α基因片段。以β-肌动蛋白(β-actin)作为内参基因,反应体系及参数依据

Promage试剂盒说明书设置,反应参数为95℃预变性2 min, 95℃变性15 s, 60℃退火60 s, 40个循环。连续检测荧光并记录扩增曲线,采用样点拟合法分析结果得到目的基因和β-actin的 C_t 值,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。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 sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 CCGTGAAAAGATGACCCAGATC	73
	下游 CACAGCCTGGATGGCTACGT	
GR	上游 AGCTCCCCCTGGTAGAGAC	120
	下游 GGTGAAGACGCAGAAACCTTG	
IL-1β	上游 CAGCAGGTTATCATCATCATCC	190
	下游 CTCGCAGCAGCACATCAAC	
IL-6	上游 AGAGATACAAAGAAATGATGGA	95
	下游 AGCTATGGTACTCCACAAGACCAGA	
TNF-α	上游 CAGCCGATGGGTTGTACCTT	81
	下游 TGTGGGTGAGGAGCACG TAGT	
Iba-1	上游 ATCAACAAGCAATTCCTCGATGA	144
	下游 CAGCATTGCTTCAAGGACATA	

2.7 统计学处理 采用SPSS 19.0软件进行统计分析,采用单因素方差分析(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)-*t*检验,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 行为学结果

3.1.1 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠中心区停留时间及运动总路程变化的影响 与正常组比较,LPS组小鼠5 min中心区停留时间有减少趋势、运动总路程显著减少($P<0.01$);与LPS组比较,MS+LPS组小鼠5 min中心区停留时间有减少趋势、运动总路程明显增长($P<0.05$);与MS+LPS组比较,温阳组小鼠5 min中心区停留时间有减少趋势,解郁组,温阳解郁组及氟西汀组小鼠5 min中心区停留时间有增长趋势,各给药组小鼠5 min运动总路程均显著减少($P<0.01$)。见表2。

3.1.2 温阳、解郁及温阳解郁方各组小鼠O迷宫开放/闭合臂活动时间及活动总路程变化的影响 与正常组比较,LPS组小鼠开放臂活动时间有减少趋势,闭合臂活动时间有增长趋势,活动总路程显著减少($P<0.01$),MS+LPS组小鼠闭合臂活动时间有

表2 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠中心区停留时间时间和运动总路程变化的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on changes of residence time in central area and total exercise distance of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	5 min 中心区停留时间/s	5 min 运动总路程/m
正常		26.20±8.62	12.46±1.20
LPS		17.57±4.10	2.04±0.75 ¹⁾
MS+LPS		13.30±2.36	12.37±0.96 ²⁾
温阳组	5.85	10.52±3.13	6.90±1.31 ³⁾
解郁	12.03	16.08±6.75	4.03±0.87 ⁴⁾
温阳解郁组	16.71	20.88±8.91	6.14±2.06 ³⁾
氟西汀	0.002 6	24.41±6.94	6.22±1.87 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与LPS组比较²⁾ $P<0.01$;与MS+LPS组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ 。

增长趋势,开放臂活动时间及活动总路程明显减少($P<0.05, P<0.01$);与LPS组比较,MS+LPS组小鼠开放臂活动时间及活动总路程有减少趋势、闭合臂活动时间有增长趋势;与MS+LPS组比较,温阳组小鼠开放臂活动时间有减少趋势,解郁、温阳解郁组及氟西汀组小鼠开放臂活动时间有增长趋势,各给药组小鼠闭合臂活动时间有减少趋势,温阳组小鼠活动总路程有降低趋势,解郁、温阳解郁组及氟西汀组小鼠活动总路程有增长趋势。见表3。

表3 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠O迷宫开放/闭合臂活动时间及活动总路程变化的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on activity time and total distance of Open/Closed arm of O maze in mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	开放臂活动时间/s	闭合臂活动时间/s	活动总路程/m
正常		21.13±7.31	3.23±1.44	3.04±1.01
LPS		12.46±5.45	6.50±0.29	0.58±0.06 ²⁾
MS+LPS		8.03±4.22 ¹⁾	6.66±1.96	0.53±0.08 ²⁾
温阳	5.85	7.88±2.44	5.04±2.35	0.36±0.07
解郁	12.03	15.12±4.86	1.02±0.51	0.84±0.12
温阳解郁组	16.71	15.19±13.94	5.51±5.35	0.54±0.18
氟西汀	0.002 6	16.54±3.85	1.34±0.77	1.72±0.74 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与MS+LPS组比较³⁾ $P<0.05$ 。

3.1.3 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠训练、辨别探查时间变化的影响 与正常组比较,LPS组小鼠训练、辨别探查时间有升高趋势,MS+LPS组小鼠训练、辨别探查时间显著升高($P<0.01$),辨别比率

均有降低趋势;与LPS组比较,MS+LPS组小鼠训练、辨别探查时间显著升高($P<0.05, P<0.01$),辨别比率均有升高趋势;与MS+LPS组比较,各给药组小鼠训练探查时间均显著降低($P<0.05, P<0.01$),温阳组小鼠辨别探查时间有降低趋势,解郁组、温阳解郁组、氟西汀组小鼠辨别探查时间均显著降低($P<0.01$),辨别比率均有升高趋势。见表4。

表4 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠训练、辨别探查时间变化的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on changes of training, discrimination and exploration time of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	训练探查时间/s	辨别探查时间/s	辨别比
正常		46.36±5.49	40.11±2.90	0.48±0.03
LPS		56.04±6.63	42.44±4.55	0.44±0.03
MS+LPS		84.41±7.05 ^{1,2)}	70.42±5.88 ^{1,3)}	0.46±0.03
温阳	5.85	51.89±8.76 ⁵⁾	56.18±4.44	0.54±0.03
解郁	12.03	58.54±8.81 ⁴⁾	49.22±6.56 ⁵⁾	0.49±0.07
温阳解郁组	16.71	49.18±5.61 ⁵⁾	44.21±4.47 ⁵⁾	0.48±0.04
氟西汀	0.002 6	50.74±8.38 ⁵⁾	42.86±4.31 ⁵⁾	0.52±0.07

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与LPS组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与MS+LPS组比较⁴⁾ $P<0.05$,⁵⁾ $P<0.01$ 。

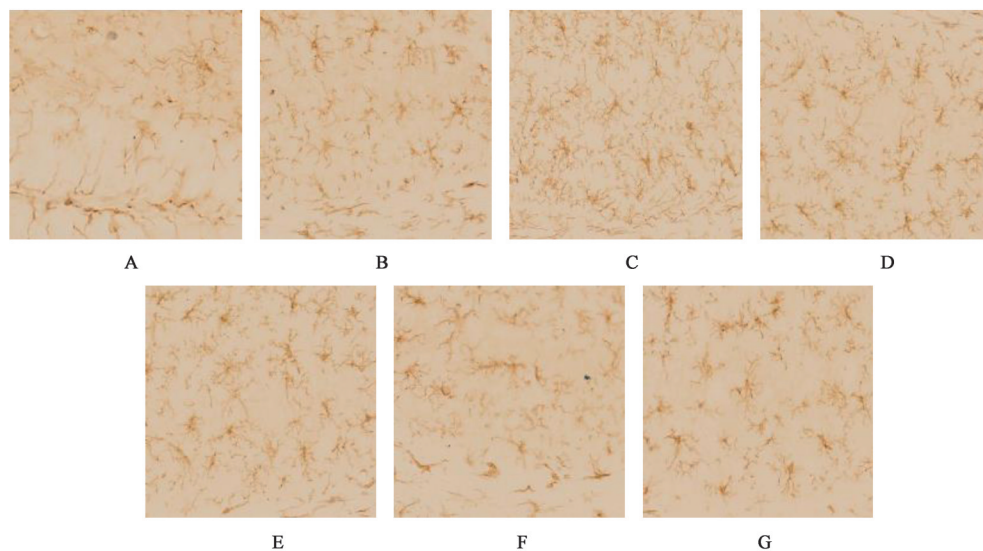
3.2 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马CA1区Iba-1变化的影响 与正常组比较,LPS,MS+LPS组小鼠海马CA1区Iba-1表达显著升高($P<0.01$);与LPS组比较,MS+LPS组小鼠海马CA1区Iba-1表达显著升高($P<0.01$);与MS+LPS组比较,各给药组小鼠海马CA1区Iba-1表达显著降低($P<0.01$)。见表5,图1。

表5 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马CA1区Iba-1变化的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on changes of Iba-1 in hippocampal CA1 of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Iba-1/IA
正常		8 206.52±199.85
LPS		15 118.15±480.94 ¹⁾
MS+LPS		20 933.51±451.42 ^{1,2)}
温阳	5.85	14 120.94±793.06 ³⁾
解郁	12.03	15 192.24±1 232.73 ³⁾
温阳解郁组	16.71	13 776.04±571.60 ³⁾
氟西汀	0.002 6	13 952.72±519.00 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与LPS组比较²⁾ $P<0.01$;与MS+LPS组比较³⁾ $P<0.01$ 。



A. 正常组; B. LPS组; C. MS+LPS组; D. 温阳组; E. 解郁组; F. 温阳解郁组; G. 氟西汀组
图1 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马组织CA1区Iba-1变化的影响(免疫组化, ×100)

Fig. 1 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on changes of Iba-1 in CA1 area of hippocampal tissue of mice in each group (IHC, ×100)

3.3 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马组织 GR, Iba-1, IL-1 β , IL-6 及 TNF- α mRNA 表达水平的影响 与正常组比较, LPS组小鼠海马组织 GR 及 TNF- α mRNA 表达水平有降低趋势, IL-1 β mRNA 表达水平有升高趋势, Iba-1, IL-6 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), MS+LPS组小鼠海马组织 GR mRNA 表达水平有降低趋势, Iba-1, IL-6, IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 LPS组比较, MS+LPS组小鼠海马组织

GR mRNA 表达水平有降低趋势, Iba-1 及 IL-6 mRNA 表达水平有升高趋势, IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 MS+LPS组比较, 各给药组小鼠海马组织 GR mRNA 表达水平有升高趋势, 其中解郁与温阳解郁组明显升高 ($P < 0.05$); Iba-1 mRNA 表达水平有降低趋势, 其中温阳解郁组显著降低 ($P < 0.01$); IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); IL-6 mRNA 表达水平有降低趋势。见表6。

表6 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠海马组织 GR, Iba-1, IL-1 β , IL-6 及 TNF- α mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 6 Effect of Wenyang, Jieyu and Wenyang Jieyu prescription on GR, Iba-1 and IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA of expression level in hippocampus of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GR	Iba-1	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常		1.10±0.47	1.51±1.11	1.11±0.44	1.37±0.83	1.29±0.74
LPS		0.88±0.53	7.13±0.62 ¹⁾	8.06±2.81	4.98±0.44 ¹⁾	1.17±1.11
MS+LPS		0.82±0.22	8.63±2.73 ¹⁾	14.26±73.87 ^{1,2)}	6.86±0.80 ¹⁾	4.27±0.88 ^{1,3)}
温阳	5.85	1.00±0.25	3.74±1.71	0.93±0.49 ⁵⁾	5.19±0.62	1.19±0.80 ⁵⁾
解郁	12.03	1.41±0.35 ⁴⁾	2.54±1.40	12.28±8.00	5.97±0.53	0.61±0.23 ⁵⁾
温阳解郁	16.71	1.49±0.42 ⁴⁾	1.39±0.41 ⁵⁾	8.01±1.95 ⁵⁾	4.43±0.30	0.84±0.50 ⁵⁾
氟西汀	0.002 6	0.85±0.24	3.65±2.23	6.31±6.84 ⁵⁾	4.73±1.00	1.94±1.140 ⁵⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$,与LPS组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$,与MS+LPS组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

抑郁症作为一种常见、难治的精神类疾病,病机复杂,社会影响严重。有学者提出单胺类神经递质、脑源性神经营养因子及神经内分泌等假说为其可能的发病机制^[2-5],认为持续的应激刺激使体内产

生过量的糖皮质激素,与海马内糖皮质激素受体结合后可损伤海马及蓝斑等处,从而导致抑郁症的发生。而中医学并无抑郁症的病名,根据抑郁症临床症状特点,将其归属于“郁证”“脏躁”“百合病”等病症范畴。明·张景岳《类经附翼·求正录》云:“天之

大宝,只此一丸红日;人之大宝,只此一息真阳”,认为人赖以肾中阳气生存,宛若世间万物赖以太阳而得以生活;又《黄帝内经·素问·生气通天论》曰:“阳者卫外而为固也”,表明阳气有抵御外界邪气,使身体屏障牢固的作用。中医学认为幼年期机体功能发育尚未成熟,肾主封藏之机能较弱,剧烈的外界刺激易使大量的阳气外泄以应对各种刺激,日久损耗阳气,可致阴阳失衡,百病乃生。张军^[14]通过对大量应用糖皮质激素药物后患者临床的反应分析,认为超生理量的激素可激发人体阳气大量外出以应对紧急事件,易使阳气耗损。短期的激素刺激则阳气消耗不巨,经机体自动调节而复归“阴平阳秘”,不会导致明显的不良反应;若长期持续刺激则阳气入不敷出进而过度外泄而不潜降,“封藏”失司,肾精亏虚,变证丛生^[14]。

随着对抑郁症研究的深入,免疫炎症假说逐渐受到众多学者的关注,认为免疫系统的激活导致细胞因子异常分泌为抑郁症发病的可能机制。研究表明抑郁症患者体内存在神经炎症反应及炎症因子分泌失衡的现象,血清IL-1 β , IL-6及TNF- α 等含量升高^[13,15],同时发现健康人群中遭受早年不良经历的健康人血浆IL-6表达水平高于未遭受早年不良经历的健康人,遭受早年不良经历的抑郁患者与未遭受早年不良经历的患者相比而言对于炎症刺激更为敏感,均表明抑郁症的发生不仅与炎症密切相关,且早年不良经历可增强炎症反应的程度^[16]。MS作为重要的早年不良经历之一,可激活中枢海马区的炎症免疫反应,进而影响海马的结构及神经发生等的功能,当遭受二次应激时,海马区炎症反应增强,可对影响神经发生和认知功能造成损伤^[17],进而诱发抑郁症。脂多糖能够引起剧烈的炎症免疫反应^[18-21],与小胶质细胞膜上的Toll样受体4(TLR4)结合,可激活小胶质细胞作为中枢神经系统的免疫细胞,可促使多种炎症介质分泌^[22-24],进而损害神经发生与认知功能,最终导致抑郁症的发生。

糖皮质激素受体作为一种配体依赖的受体在海马区高表达^[25],激活后的糖皮质激素可作用于核转录因子- κ B(NF- κ B)和激活子蛋白-1(AP-1),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 β , IL-6, TNF- α 等炎症因子的释放水平^[26-27],而不良应激会损害HPA功能,导致海马区GR表达下调。本研究结果显示,LPS干预后脑内小胶质细胞被激活,由静息状态的分枝状变成典型的“阿米巴”样。MS+LPS组小鼠海马区Iba-1, IL-1 β ,

IL-6及TNF- α mRNA表达水平显著升高,而GR mRNA表达水平有降低趋势,表明MS小鼠遭受LPS刺激后脑内小胶质细胞被激活,并释放大量促炎细胞因子,引起炎症反应,为抑郁症发生的可能原因之一。温阳解郁方预防给药后海马区Iba-1, IL-1 β , IL-6及TNF- α mRNA表达水平显著降低,增加GR mRNA的表达水平显著升高,表明温阳解郁方的抗抑郁作用可能与降低炎症因子的表达有关。MS+LPS组小鼠5 min及30 min活动总路程显著缩短,LPS组比正常组小鼠的活动路程显著缩短,表明MS小鼠遭受LPS刺激后其自主活动受到影响,进入新的空旷环境后其行动相对迟缓、自发探索行为减弱,且LPS小鼠对炎症刺激更为敏感。MS+LPS组小鼠在开臂活动时间和活动总路程明显缩短,表明MS小鼠成年后遭受LPS刺激后表现更加焦虑、面对新环境时其探索意识减弱,对高悬开放臂的恐惧心理增加。LPS+MS组小鼠的训练探查时间和辨别探查时间显著延长,说明MS小鼠在遭受LPS刺激后对陌生同类的警惕性增强,社会交互能力降低。通过预防给药发现,二仙汤、逍遥散及温阳解郁方均可缓解MS+LPS小鼠出现的焦虑、抑郁样行为,温阳解郁方对MS+LPS小鼠大脑小胶质细胞功能状态变化的调节作用明显,可提高中枢糖皮质激素受体的表达,相较于二仙汤和逍遥散,温阳解郁方的作用更为全面和广泛。

本实验结果显示,在发育期给予温阳解郁方药物干预对母婴分离小鼠在面对二次打击时所表现的异常行为和小胶质细胞的异常具有明显改善作用,可为遭受早年不良经历后所患相关病症的早期防治提供思路和实验依据。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 中国居民营养与慢性病状况报告(2020年)[J]. 营养学报,2020,42(6):521.
- [2] 付琳,李冀,董婉茹,等. 基于“神经-内分泌-免疫”调节机制探讨针刺治疗抑郁症的研究概况[J]. 针灸临床杂志,2021,37(4):93-97.
- [3] 据李亮,曹月,赵炳佳,等. BDNF/TrkB与抑郁症的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2021,30(9):1014-1017.
- [4] MA H, LI C Y, WANG J P. 杏仁核-海马环路参与抑郁症的发病机制[J]. 中国疼痛医学杂志,2021,27(2):93.
- [5] 高贵元,黄捷,刘丹,等. 抑郁症的发病机制及抗抑郁

- 药物的研究进展[J]. 中国医药导报, 2021, 18(1): 52-55, 70.
- [6] 龙健, 欧阳瑶. 慢性阻塞性肺疾病合并抑郁、焦虑的血清炎症因子[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(10): 2223-2228.
- [7] 王雅萍, 王晓丹, 叶佳. 首发抑郁症中青年患者肠道菌群与细胞因子的关联性研究[J]. 山西医药杂志, 2021, 50(8): 1303-1305.
- [8] AMIRI S, AMINI-KHOEI H, MOHAMMADI-ASL A, et al. Involvement of D1 and D2 dopamine receptors in the antidepressant-like effects of selegiline in maternal separation model of mouse[J]. *Physiol Behav*, 2016, 163: 107-114.
- [9] LUPIEN S J, MCEWEN B S, GUNNAR M R, et al. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(6): 434-445.
- [10] SHIN S Y, HAN S H, WOO R S, et al. Adolescent mice show anxiety- and aggressive-like behavior and the reduction of long-term potentiation in mossy fiber-CA3 synapses after neonatal maternal separation[J]. *Neuroscience*, 2016, 316: 221-231.
- [11] 王维刚, 刘震泽, 吴文婷, 等. 小鼠动物实验方法系列专题(七)旷场实验在小鼠行为分析中的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(11): 1191-1196.
- [12] WANG Y, GAO C, GAO T, et al. Plasma exosomes from depression ameliorate inflammation-induced depressive-like behaviors via sigma-1 receptor delivery[J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 94: 225-234.
- [13] 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.
- [14] 张军. 糖皮质激素性骨质疏松症的中医病机及封髓潜阳微粉作用机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2006.
- [15] DUTCHER E G, PAMA E, LYNALL M E, et al. Early-life stress and inflammation: a systematic review of a key experimental approach in rodents [J]. *Brain Neurosci Adv*, 2020, doi: 10.1177/2398212820978049.
- [16] MARAIS L, VAN RENSBURG S J, VAN ZYL J M, et al. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus[J]. *Neurosci Res*, 2008, 61(1): 106-112.
- [17] 姜牧君, 陈育华, 屈晓龙, 等. LPS诱导慢性帕金森病小鼠模型的建立与评价[J]. 解剖学研究, 2016, 38(5): 391-395, 426.
- [18] 常广军. 脂多糖对反刍动物肝脏天然免疫反应的影响及表观遗传机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [19] 王艳婕, 曹威, 李庆丽, 等. 阿戈美拉汀联合解郁丸治疗对抑郁症患者炎症因子和脑源性神经营养因子的影响[J]. 中国慢性病预防与控制, 2020, 28(1): 61-63.
- [20] 赵永伟, 牛玉, 何进田, 等. 双氢青蒿素对脂多糖诱导的断奶仔猪肝脏炎症以及脂代谢的影响[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(01): 202-208.
- [21] 管琼, 胡荣, 罗先钦. 小儿肺咳颗粒对脂多糖致大鼠慢性支气管炎的防治作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(8): 2112-2118.
- [22] DUMAN R S, AGHAJANIAN G K, SANACORA G, et al. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants [J]. *Nat Med*, 2016, 22(3): 238-249.
- [23] YU H, CHEN Z Y. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(1): 3-11.
- [24] 施学丽, 曹智怡, 马晓聪, 等. 对药酸枣仁-合欢花对抑郁模型大鼠行为学及皮质ERK-CREB细胞信号转导通路的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(1): 8-14.
- [25] JURUENA M F, GADELRA B R, CLEARE A J, et al. Epigenetics: a missing link between early life stress and depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 109: 110231.
- [26] DE BOSSCHER K, VANDEN BERGHE W, VERMEULEN L, et al. Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(8): 3919-3924.
- [27] 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.

[责任编辑 周冰冰]