

## 柴胡加龙骨牡蛎汤对慢性应激抑郁大鼠海马 BDNF/TrkB/CREB通路的影响

王钦, 蔡萧君\*, 李宇, 吴圆圆, 胡杨, 李文丽, 余真真  
(黑龙江省中医药科学院, 哈尔滨 150000)

**[摘要]** 目的: 基于脑源性神经营养因子(BDNF)/络氨酸激酶B(TrkB)/环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)途径探讨柴胡加龙骨牡蛎汤对慢性应激抑郁大鼠海马的影响。方法: 取60只SD大鼠, 其中10只作为空白组, 余50只建立慢性应激抑郁大鼠模型后, 随机分为5组, 即模型组, 盐酸氟西汀组( $0.003\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组( $1.625, 3.25, 6.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。连续灌胃给药8周, 1次/d, 分别于造模前、造模后及给药后进行行为学实验评估大鼠抑郁状态。苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠海马形态学变化, 免疫组织化学法(IHC)检测大鼠海马组织中BDNF蛋白表达, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠海马组织中BDNF, TrkB, CREB mRNA表达, 蛋白免疫印迹法(Western blot)定量检测大鼠海马组织中BDNF, TrkB, CREB蛋白表达。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠糖水偏嗜率明显降低( $P<0.05$ ), 水平得分、垂直得分明显降低( $P<0.05$ ), 不动时间明显增加( $P<0.05$ ), 漂浮时间显著增加( $P<0.05$ ), HE染色结果显示海马神经元结构损伤, 免疫组织化学染色中BDNF表达明显降低( $P<0.05$ ), BDNF, TrkB, CREB mRNA及蛋白表达明显降低( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 盐酸氟西汀组及柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组大鼠糖水偏嗜率明显升高( $P<0.05$ ), 水平得分、垂直得分明显增加( $P<0.05$ ), 不动时间明显减少( $P<0.05$ ), 漂浮时间明显减少( $P<0.05$ ), 海马神经元结构明显复原, 免疫组织化学染色中BDNF表达明显增加( $P<0.05$ ), BDNF, TrkB, CREB mRNA及蛋白表达明显增加( $P<0.05$ )。结论: 柴胡加龙骨牡蛎汤能显著改善慢性应激刺激后大鼠的抑郁样行为, 增强海马组织神经元的再生与修复, 其机制可能与上调大鼠海马BDNF/TrkB/CREB信号通路有关。

**[关键词]** 柴胡加龙骨牡蛎汤; 抑郁; 海马; 脑源性神经营养因子(BDNF)/络氨酸激酶B(TrkB)/环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB); 机制研究

[中图分类号] R2-0;R289;R33;R745.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)21-0037-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212136

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210917.2157.003.html>

[网络出版日期] 2021-09-22 14:37

### Effect and Mechanism of Chaihu Jia Longgu Muli Tang on Hippocampus of Rats with Chronic Stress Depression Based on BDNF/TrkB/CREB Pathway

WANG Qin, CAI Xiao-jun\*, LI Yu, WU Yuan-yuan, HU Yang, LI Wen-li, YU Zhen-zhen  
(Traditional Chinese Medicine Academy of Heilongjiang, Harbin 150000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Chaihu Jia Longgu Muli Tang on the hippocampus of rats with chronic stress depression based on the brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/tyrosine kinase B (TrkB)/cyclic adenosine phosphate response element-binding protein (CREB) pathway. **Method:** Sixty SD rats were divided into a blank group ( $n=10$ ) and an experimental group ( $n=50$ ) for the induction of the chronic stress depression model. The rats in the experimental group were further divided into the following five groups: a model group, a fluoxetine hydrochloride group ( $0.003\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and low- ( $1.625\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), medium- ( $3.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and high-dose ( $6.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Chaihu Jia Longgu Muli Tang groups. The rats were administered correspondingly by gavage

[收稿日期] 20210812(004)

[基金项目] 黑龙江省应用技术与开发计划项目(GA19C108)

[第一作者] 王钦, 在读硕士, 从事中西医结合内分泌研究, E-mail: 2628846034@qq.com

[通信作者] \* 蔡萧君, 博士, 主任医师, 从事中西医结合内分泌伴躯体性疾病研究, E-mail: ssycxj@163.com

once a day for eight weeks. Behavioral tests were performed to evaluate the depression state of the rats before modeling, after modeling, and after drug administration. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes in the hippocampus of rats. The immunohistochemical (IHC) staining was used to quantitatively detect BDNF protein expression in the rat hippocampus. The mRNA and protein expression of BDNF, TrkB, and CREB in the rat hippocampus was detected by the real-time fluorescence-based quantitative PCR (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed decreased sucrose preference rate ( $P<0.05$ ), declining horizontal and vertical scores ( $P<0.05$ ), and prolonged immobility time and floating time ( $P<0.05$ ). Additionally, HE staining results revealed that hippocampal neuron structure was damaged. IHC staining showed that the mRNA and protein expression of BDNF, TrkB, and CREB was significantly decreased ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the fluoxetine hydrochloride group and the Chaihu Jia Longgu Muli Tang groups displayed elevated sucrose preference rate ( $P<0.05$ ), increased horizontal and vertical scores ( $P<0.05$ ), and shortened immobility time and floating time ( $P<0.05$ ). Furthermore, the hippocampal neuron structure was significantly repaired. IHC staining showed that the mRNA and protein expression of BDNF, TrkB, and CREB was significantly increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Chaihu Jia Longgu Muli Tang can significantly improve the depression-like behaviors of rats after chronic stress stimulation and enhance the regeneration and repair of neurons in the hippocampus. The underlying mechanism may be related to the up-regulation of the BDNF/TrkB/CREB signaling pathway in the hippocampus of rats.

**[Keywords]** Chaihu Jia Longgu Muli Tang; depression; hippocampus; brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/tyrosine kinase B (TrkB)/cyclic adenosine phosphate response element binding protein (CREB); mechanism study

抑郁症是一种多因素引起的精神心理性疾病,临床特征主要以心境低落、欢欣感缺失、精力较差或疲劳感等心理症状及躯体症状为主<sup>[1]</sup>。目前全球抑郁症患者约有3.5亿,中国的患病人群高达5 800万,其中7%为重度抑郁。全世界非正常死亡和致残的主要原因非抑郁症莫属,该病发病率高、致残率高、复发率高及并发症多的特点也使其成为对人类健康和社会经济造成严重威胁的全球最主要疾病之一<sup>[2-3]</sup>。因此,探索更多减少副作用和成本的有效治疗措施成为当务之急。

现阶段抑郁症发病机制主要与单胺类递质分泌减少、下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)的功能失调、大脑皮层及边缘系统的结构功能改变、脑血管低灌注、线粒体能量代谢障碍、环境应激和表观遗传修饰、肠道菌群紊乱、机体自由基增多、体内锌铜含量异常、脑源性神经营养因子(BDNF)水平下调和神经可塑性改变等有关<sup>[4-6]</sup>,其中BDNF是5-羟色胺(5-HT)能神经元的生长因子,在海马大量表达,能够通过多种分泌方式与其特异性受体酪氨酸激酶B(TrkB)结合,促使细胞内环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)磷酸化从而改善抑郁症状<sup>[7-8]</sup>。目前西药的抗抑郁作用大多基于单胺类假说,但其治疗周期长、治愈率低、复发率高、副作用大和患者依从

性差限制了其在临床的广泛应用<sup>[9]</sup>。而中医药在抗抑郁治疗方面具有多靶点、多环节及毒副作用小等优势,可为抑郁症的治疗提供新的方向。

抑郁症与《伤寒论》中的“烦”“奔豚”“不得眠”“多眠睡”“百合病”“脏躁”“梅核气”有关,病位涉及五脏六腑,病机关乎气血阴阳,可从脏腑、瘀血、痰湿等方面辨证论治<sup>[10]</sup>。柴胡加龙骨牡蛎汤系《伤寒论》经方,可和解泄热、镇惊安神,是治疗抑郁症的常用方<sup>[11-12]</sup>。目前研究表明,柴胡加龙骨牡蛎汤干预抑郁症的具体机制与影响大脑单胺类神经递质含量、调节HPA轴功能、抑制单胺氧化酶A型(MAO-A)活力和降低丙二醛(MDA)含量、保护海马神经元及提高星形胶质细胞表达、调节血清及海马BDNF水平、调节患者血清细胞因子水平有关<sup>[13-15]</sup>。其中针对BDNF的研究仍以临床实验居多,实验设计较为表浅,并且部分研究以药物有效成分探讨柴胡加龙骨牡蛎汤的抗抑郁作用,而中医经方的本质是药性与功效的和合,所以关于柴胡加龙骨牡蛎汤具体是如何调节海马BDNF水平发挥抗抑郁作用,是否与海马BDNF相关信号通路有关还有待探讨。

本研究旨在通过慢性应激刺激结合孤养建立抑郁大鼠模型,经糖水偏嗜、旷场、悬尾、强迫游泳、

病理染色、免疫组织化学(IHC)染色、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot),从行为学、细胞生物学、基因检测、分子免疫学等方面较全面分析柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠的影响,以期为干预抑郁症的研究提供新的靶向药物思路及循证学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 8周龄SD雄性大鼠60只,体质量(200±20)g,于黑龙江省中医药科学院清洁级动物实验室进行饲养,温度(20±1)℃,相对湿度(50±5)%,每日12 h光照,自由摄食饮水,适应性喂养1周后开始进行实验。实验动物均由哈尔滨医科大学实验动物学部提供,动物合格证号SCXK(黑)2020-0001。本实验通过黑龙江省中医药科学院动物伦理委员会批准。

**1.2 药物** 盐酸氟西汀分散片(百忧解,法国Lilly公司,批号9492AA);柴胡加龙骨牡蛎汤由柴胡25 g,龙骨25 g,牡蛎25 g,人参10 g,桂枝15 g,茯苓15 g,清半夏10 g,黄芩10 g,大黄6 g,生姜10 g,大枣5 g组成,均为中药免煎颗粒剂,由江阴天江药业有限公司提供,批号分别为18100014,19056424,19056614,19071681,18100164,19071191,19052351,19020124,18110294,18100154,19046814。按比例换算备齐全部颗粒剂后研钵碾细使其能充分溶解,100℃恒温水浴后玻璃棒搅拌至完全溶解,定容至360 mL,生药量为0.26 g·mL<sup>-1</sup>,放入4℃冰箱备用。

**1.3 试剂** 苏木精染液,伊红染液,BSA标准蛋白,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为908E035,304H021,131070,20210421);超敏ECL化学发光试剂盒(万类生物科技有限公司,批号18A011);一步法PCR试剂盒(中国Promega公司,批号0000383124);TRIzol(上海碧云天生物技术有限公司,批号R0016);Bradford法蛋白检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号80814a);PMSF蛋白酶抑制剂(赛默飞世尔科技有限公司,批号20150609);BDNF,TrkB,CREB, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国Bioss公司,批号分别为59n3149,61a1977,36v1551,AH11286487);辣根过氧化物酶(HRP)结合山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号210060330)。

**1.4 仪器** JA31002型电子精密天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);BX41型荧光显微镜(日本

Olympus公司);CUT4062型石蜡切片机(德国SLEE公司);LINEGENE 9600型Real-time PCR仪(日本大和博日公司);M20型多功能酶标仪(奥地利Ttcan公司);DYCP-31DN型电泳仪,DY CZ-26B型垂直电泳槽,DYY-6C型电泳仪电源(北京六一仪器厂);HD-100型恒温金属浴(杭州博日公司);Quantity One软件,ACDSee 5.0软件,VersaDoc显影仪器(美国Bio-Rad公司);凝胶成像系统(美国伯乐公司);悬尾仪,摄像头(江苏赛昂斯生物科技有限公司);自制100 cm×100 cm×40 cm敞箱。

## 2 方法

**2.1 动物分组、造模及给药** 将60只SPF级饲养的雄性SD大鼠按照空白、模型、盐酸氟西汀、柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量进行分组,分组方法均采用随机数字表法。6组大鼠均每天12 h光照维持,自由进食饮水。普通饲料适应性喂养1周后,除空白组外的各组均进行孤养结合慢性不可预知温和应激(CUMS)大鼠模型<sup>[16]</sup>的制备:禁食禁水24 h,昼夜颠倒,电击足底(电流强度1 mA,每隔30 s刺激1次,共30次),悬尾(3 min/次),鼠笼24 h倾斜45°,潮湿垫料,4℃冰水游泳(5 min/次),共7项。除正常组外,6周造模期内应激刺激每天施加1次,每种随机施加4次。孤养意思为1笼只放置1只大鼠,各笼子之间用不透光挡板遮挡。观察大鼠的活动、进食情况、对刺激的应激反应,为造模成功标准提供参考<sup>[17]</sup>。造模成功后,50只大鼠按体质量随机分为模型组,盐酸氟西汀组(0.003 g·kg<sup>-1</sup>),柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组(1.625,3.25,6.5 g·kg<sup>-1</sup>),每组10只,给药剂量设计依据参考本课题组前期实验<sup>[18]</sup>。连续8周灌胃(1次/d)后,通过行为学实验(糖水偏嗜实验、旷场实验、悬尾实验和强迫游泳实验)对各组大鼠表现进行计算和评分。分别于第1,7周(造模后)及15周(给药后)记录大鼠体质量变化。

**2.2 糖水偏嗜实验** 实验前,训练各组大鼠适应糖水,即第1天给予每只孤养大鼠2瓶均装有1%蔗糖水的外观、体积完全相同的水瓶(200 mL)完成训练,1 d后将其中一瓶糖水换成等体积蒸馏水并且每只大鼠开始禁食,次日测量糖水、纯水前1 d的消耗量,采用公式“糖水偏嗜率(%)=糖水消耗量(mL)/总液体(糖水+纯水)消耗量(mL)×100%”分别计算各组大鼠糖水偏嗜率。本实验分别于造模前、造模后、给药后进行(2.3项,2.4项及2.5项同)。

**2.3 旷场实验** 实验时,使大鼠于黑色敞箱底部中心方格内适应5 min后,采用Anilab软件计算每只

大鼠规定时间内的运动轨迹和行为。计算大鼠5 min内的水平活动得分(穿越底面方格数)及垂直活动得分(前肢腾空或攀附在箱壁次数)。

**2.4 悬尾实验** 倒挂大鼠,将其尾巴(距离末端约1 cm)固定在桌面上方50 cm处的金属棒上,各大鼠之间用聚苯乙烯泡沫隔板隔离,采用悬尾仪及摄像头观察大鼠在3 min内的悬尾不动时间,以大鼠的绝望行为表示其抑郁行为。

**2.5 强迫游泳实验** 将大鼠放入无盖、透明的有机玻璃圆桶中,水深约30 cm,水温(20±2)°C,使大鼠入水时处于直立状态,记录大鼠5 min内累计不动时间(以四肢偶尔微小滑动保持头部浮在水面露出鼻孔保持呼吸为“不动”标准),实验时各玻璃桶间用隔板隔离,每只动物做完后即换水并将大鼠擦干。

**2.6 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠海马病理形态学变化** 行为学检测结束后,将固定于4%多聚甲醛溶液24 h的大鼠脑组织制成蜡块并进行切片,后经脱蜡,水化,HE染色,脱水,中性树胶封片,高倍显微镜(×200)观察海马形态学变化。

**2.7 IHC检测大鼠海马组织中BDNF蛋白表达** 行为学检测结束后,将浸泡于4%多聚甲醛中的大鼠脑组织制成蜡块并进行切片,再进行免疫组织化学染色实验,显微镜(×400)观察,通过IHC评分法<sup>[18]</sup>计算各组得分,各切片选取3个视野,根据着色深浅、着色面积计分:着色浅表现为弱阳性或着色面积范围<25%,计1分;着色棕黄表现为中等阳性或着色面积范围在25%~49%,计2分;着色褐色表现为强阳性或着色面积范围>50%,计3分。再以着色深浅、着色面积相乘综合积分计量,<3分为阴性,>4分为阳性,>6分为强阳性。

**2.8 Real-time PCR检测大鼠海马组织中BDNF, TrkB, CREB mRNA表达** 行为学检测结束后,大鼠脑组织中的皮层和海马组织分离,-80 °C保存,取单个样本海马组织50 mg液氮研磨后提取总RNA,行Real-time PCR检测,加样,目的基因及内参分别平行对照上样3个孔。迷你离心机500 r·min<sup>-1</sup>离心30 s(离心半径1.8 cm),后将其置于96孔PCR反应板中,启动9600 PCR扩增仪进行扩增循环。PCR反应条件为37 °C反转录15 min;95 °C预变性10 min;95 °C变性10 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,40个循环。以β-actin为内参,最终各目的基因相对表达量以2<sup>-ΔΔCt</sup>值为准。PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
BDNF	上游 TAGGCAGAATGAGCAATGTC	178
	下游 CCCAAGAGGTAAAGGTAGAGAAG	
TrkB	上游 TGCTCAAGTTGGCGAGACAT	304
	下游 GTCCCAGGAGTTCAGCTCAC	
CREB	上游 TGTTGTTCAAGCTGCCTCTGGTG	126
	下游 GCTTCTTCAGCAGGCTGTGTAGG	

**2.9 Western blot检测大鼠海马组织中BDNF, TrkB, CREB蛋白表达** 行为学检测结束后,将大鼠脑组织中的皮层和海马组织分离后放入-80 °C保存。取单个样本50 mg海马组织于1.5 mL离心管中,加入细胞裂解液450 μL,研磨机中研磨,冰上静置30 min经电子秤配平,4 °C,13 500 r·min<sup>-1</sup>离心30 min(离心半径3.5 cm),取上清分装。将目的蛋白与裂解液混匀后稀释,进行蛋白样品浓度测定。PVDF膜室温摇床4 h。将经TBST清洗过的PVDF膜置于稀释后的BDNF, TrkB, CREB(稀释倍数均为1:1 000),4 °C孵育过夜。次日取出PVDF膜置于TBST漂洗3次,每次10 min,加入二抗(1:5 000)摇床室温避光慢摇1 h,后进行化学发光显影等操作。

**2.10 统计学分析** 采用SPSS 26.0统计软件进行数据分析,两组计量资料如符合正态分布,方差齐则采用t检验,方差不齐用t'检验,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;非正态分布时采用秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对抑郁大鼠体质量的影响** 与空白组比较,模型组大鼠体质量明显减少( $P < 0.05$ );与模型组比较,各给药组大鼠体质量均有所增加,其中以盐酸氟西汀组,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组较为明显( $P < 0.05$ )。见表2。

**3.2 对抑郁大鼠糖水偏嗜率的影响** 与空白组比较,模型组大鼠糖水偏嗜率明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,盐酸氟西汀组,柴胡龙骨牡蛎汤各剂量组糖水偏嗜率明显升高( $P < 0.05$ ),盐酸氟西汀组、柴胡龙骨牡蛎汤中、高剂量组升高较明显。见表3。

**3.3 对抑郁大鼠旷场实验水平得分和垂直得分的影响** 与空白组比较,模型组大鼠水平得分、垂直得分明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,各给药组水

表2 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Tang on body weight of rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	体质量/g		
		造模前	造模后	给药后
空白		206.58±5.79	215.21±6.03	203.69±4.06
模型		209.21±7.56	175.38±6.24 <sup>1)</sup>	180.85±5.13
盐酸氟西汀	0.003	217.82±6.77	170.27±7.31	211.27±6.34 <sup>2)</sup>
柴胡加龙骨牡蛎汤	1.625	218.27±8.25	171.26±6.92	200.50±5.78 <sup>2)</sup>
	3.25	205.27±7.01	169.34±5.86	204.25±6.39 <sup>2)</sup>
	6.5	213.65±6.53	176.15±6.94	208.85±7.06 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ (表3~8同)。

表3 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠糖水偏嗜率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Tang on preferential rate of sugar and water in rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	糖水偏嗜率/%		
		造模前	造模后	给药后
空白		62.25±3.12	63.53±1.17	61.09±2.65
模型		65.61±2.12	41.28±2.58 <sup>1)</sup>	39.95±1.66
盐酸氟西汀	0.003	63.17±0.20	40.37±2.49	57.24±1.16 <sup>2)</sup>
柴胡加龙骨牡蛎汤	1.625	62.38±2.75	42.12±1.48	49.93±0.78 <sup>2)</sup>
	3.25	64.36±1.19	39.94±0.36	55.06±2.21 <sup>2)</sup>
	6.5	63.55±0.89	40.66±3.07	57.34±0.56 <sup>2)</sup>

平及垂直得分明显升高( $P<0.05$ ),盐酸氟西汀组及柴胡龙骨牡蛎汤中、高剂量组升高明显。见表4。

表4 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠矿场实验水平得分和垂直得分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Tang on horizontal score and vertical score in rat mine experiment ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	水平得分			垂直得分		
		造模前	造模后	给药后	造模前	造模后	给药后
空白		59.82±4.50	60.43±3.07	60.22±2.94	17.29±0.77	16.68±1.20	16.91±2.70
模型		60.78±3.17	46.11±1.81 <sup>1)</sup>	48.67±2.37	17.90±1.21	7.37±0.53 <sup>1)</sup>	4.65±2.09
盐酸氟西汀	0.003	62.28±2.67	43.20±1.79	49.36±1.49 <sup>2)</sup>	16.98±2.49	6.85±0.96	13.07±1.66 <sup>2)</sup>
柴胡加龙骨牡蛎汤	1.625	59.60±2.52	40.68±2.39	42.67±2.37 <sup>2)</sup>	18.91±3.33	7.97±1.09	8.65±2.75 <sup>2)</sup>
	3.25	57.33±4.07	44.12±1.80	46.60±1.89 <sup>2)</sup>	16.20±1.06	6.32±2.40	10.73±1.49 <sup>2)</sup>
	6.5	61.49±3.62	45.37±4.98	50.75±3.89 <sup>2)</sup>	15.64±2.31	6.94±3.17	12.50±3.15 <sup>2)</sup>

3.4 对抑郁大鼠悬尾实验不动时间的影响 与空白组比较,模型组大鼠悬尾不动时间明显增加( $P<0.05$ );与模型组比较,经过盐酸氟西汀,柴胡加龙骨牡蛎汤各剂量灌胃后,各给药组悬尾不动时间明显减少( $P<0.05$ ),并以盐酸氟西汀组,柴胡龙骨牡蛎汤中、高剂量组减少较为明显。见表5。

3.5 对抑郁大鼠强迫游泳实验漂浮时间的影响 与空白组比较,模型组大鼠游泳漂浮时间明显增加( $P<0.05$ );与模型组比较,经过盐酸氟西汀,柴胡

加龙骨牡蛎汤各剂量灌胃后,各给药组游泳漂浮时间显著减少( $P<0.05$ ),并以盐酸氟西汀组,柴胡龙骨牡蛎汤中、高剂量组减少较为明显。见表6。

3.6 对抑郁大鼠海马组织病理形态学的影响 造模前,空白组大鼠海马神经元排列规整,形态规则,染色视野清晰,胞间均匀。与空白组比较,模型组大鼠海马神经元排列紊乱无序,锥体细胞散在分布,形态无规则,胞核固缩;与模型组比较,各给药组海马神经元数量增加,染色较为清晰,锥体细胞

表5 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠悬尾实验不动时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 5 Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Tang on immobility time of rats' tail suspended ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	不动时间/s		
		造模前	造模后	给药后
空白		64.16±2.97	63.12±3.03	62.58±0.46
模型		61.24±2.15	119.89±2.64 <sup>1)</sup>	120.12±3.15
盐酸氟西汀	0.003	62.42±0.97	120.72±1.66	82.47±2.34 <sup>2)</sup>
柴胡加龙骨牡蛎汤	1.625	59.60±2.52	115.68±2.43	109.60±1.43 <sup>2)</sup>
	3.25	57.33±1.07	119.18±3.43	94.68±1.89 <sup>2)</sup>
	6.5	65.81±1.57	119.80±2.59	80.41±2.09 <sup>2)</sup>

表6 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠强迫游泳实验漂浮时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 6 Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Tang on floating time of depressed rats in forced swimming experiment ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	漂浮时间/s		
		造模前	造模后	给药后
空白		82.35±16.20	85.42±13.24	86.17±17.41
模型		84.53±15.81	254.70±17.64 <sup>1)</sup>	230.52±18.20
盐酸氟西汀	0.003	81.42±14.70	209.22±10.10	146.84±12.79 <sup>2)</sup>
柴胡加龙骨牡蛎汤	1.625	80.69±12.52	222.14±13.45	195.26±13.56 <sup>2)</sup>
	3.25	83.73±13.07	219.18±13.43	170.85±15.14 <sup>2)</sup>
	6.5	86.20±11.68	230.83±15.47	139.96±10.31 <sup>2)</sup>

排列整齐, 偶见胞核深染, 细胞体较大。见图1。

**3.7 对抑郁大鼠海马组织中BDNF定位表达的影响** 与空白组比较, 模型组大鼠BDNF表达明显减少 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 经过盐酸氟西汀, 柴胡加龙骨牡蛎汤各剂量灌胃后, 各给药组BDNF表达明显增多 ( $P < 0.05$ ), 并以盐酸氟西汀组, 柴胡龙骨牡蛎汤中、高剂量组增多较为明显。见图2。

**3.8 对抑郁大鼠海马BDNF, TrkB, CREB mRNA表达的影响** 与空白组比较, 模型组大鼠海马中BDNF, TrkB, CREB mRNA表达明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 经盐酸氟西汀, 柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量灌胃后, 各给药组大鼠海马组织中BDNF, TrkB, CREB mRNA表达明显升高 ( $P <$

$0.05$ ), 并以盐酸氟西汀组, 柴胡龙骨牡蛎汤中、高剂量组升高较为明显。见表7。

**3.9 对抑郁大鼠海马组织BDNF, TrkB, CREB蛋白相对表达的影响** 与空白组比较, 模型组大鼠海马中BDNF, TrkB, CREB蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 经盐酸氟西汀, 柴胡加龙骨牡蛎汤各剂量灌胃后, 各给药组大鼠海马组织中BDNF, TrkB, CREB蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ ), 并以盐酸氟西汀组, 柴胡龙骨牡蛎汤中、高剂量组升高较为明显。见图3, 表8。

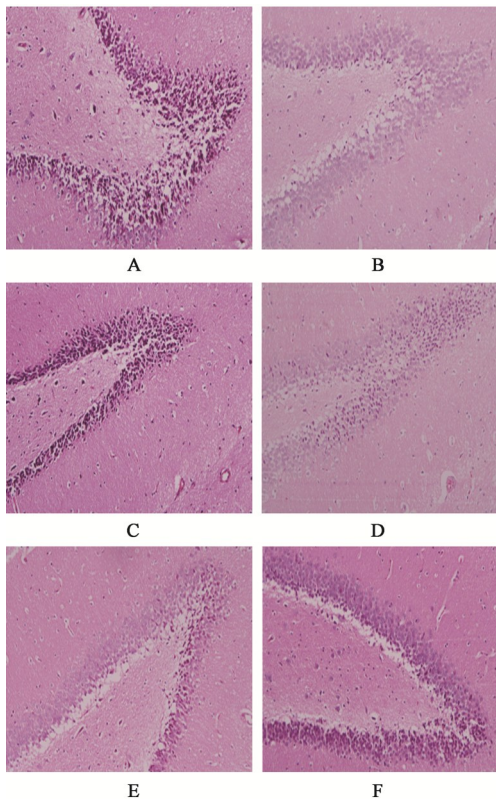
#### 4 讨论

研究表明, 经各种不可预测轻度压力的慢性刺激后建立模型(CUMS模型)是研究动物抑郁症的

表7 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马BDNF, TrkB, CREB mRNA相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 7 Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Tang on relative expression of BDNF, TrkB, CREB mRNA in hippocampus of depressed rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	BDNF	TrkB	CREB
空白		1.00±0.02	1.00±0.06	1.00±0.07
模型		0.86±0.04 <sup>1)</sup>	0.94±0.10 <sup>1)</sup>	0.82±0.03 <sup>1)</sup>
盐酸氟西汀	0.003	2.66±0.11 <sup>2)</sup>	1.23±0.09 <sup>2)</sup>	1.05±0.05 <sup>2)</sup>
柴胡加龙骨牡蛎汤	1.625	1.57±0.13 <sup>2)</sup>	1.01±0.12 <sup>2)</sup>	0.99±0.11 <sup>2)</sup>
	3.25	2.06±0.08 <sup>2)</sup>	1.10±0.13 <sup>2)</sup>	1.01±0.02 <sup>2)</sup>
	6.5	3.05±0.05 <sup>2)</sup>	1.19±0.08 <sup>2)</sup>	1.04±0.03 <sup>2)</sup>



A. 空白组; B. 模型组; C. 盐酸氟西汀组; D. 柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组; E. 柴胡加龙骨牡蛎汤中剂量组; F. 柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量组

图1 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马组织病理性的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Tang on pathological changes of hippocampus in depressed rats (HE, ×200)

最佳验证啮齿动物模型之一, 因为其具有良好的病因学效应、表面效应和预测效应<sup>[19]</sup>, 是用于分析抑郁症病理生理学基础的细胞和分子机制的动物抑郁症模型<sup>[20]</sup>。CUMS模型也是被用于研究海马治疗的可能目标, 可模拟多种慢性生活压力引发的抑郁症。经过对CUMS诱导模型中的抑郁样行为, HPA轴, BDNF和神经胶质功能的变化观察, 发现该模型与抑郁症患者存在高度相似性, 即慢性应激可导致体质量改变、糖水摄入减少、快感缺乏、自发和探索行为减少等, 而糖水偏嗜实验、旷场实验、悬尾实验、强迫游泳实验分别是比较被公认的可以用来验证药物抗抑郁效果的行为学实验之一<sup>[21]</sup>。糖水偏嗜实验中的糖水偏嗜率可代表快感缺乏样行为, 这是人类重度抑郁症的核心症状<sup>[22]</sup>, 旷场实验中的运动活动反映了顽固性兴趣丧失行为<sup>[23]</sup>, 悬尾实验、强迫游泳实验期间的不动时间可以用以评估抑郁症中的绝望行为<sup>[24]</sup>。BDNF与抑郁样行为密切相关, 较低的BDNF水平会增加抑郁样行为, 而较高

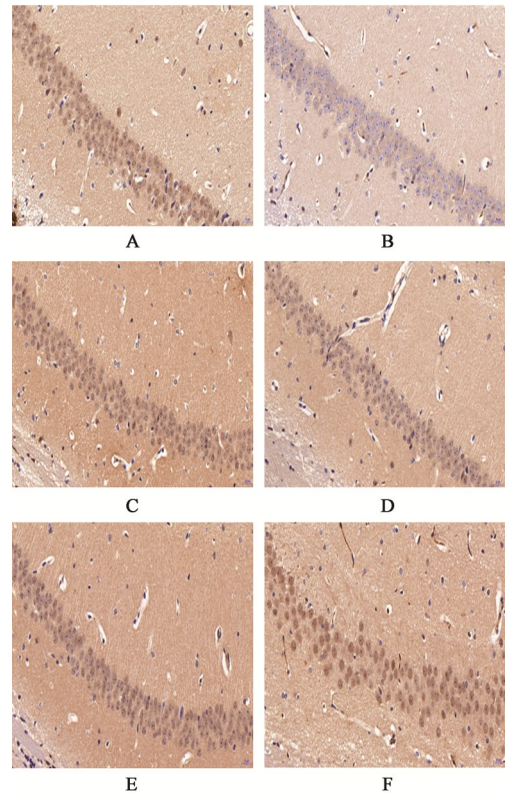


图2 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马组织中BDNF蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Tang on BDNF expression in hippocampus of depressed rats (IHC, ×400)

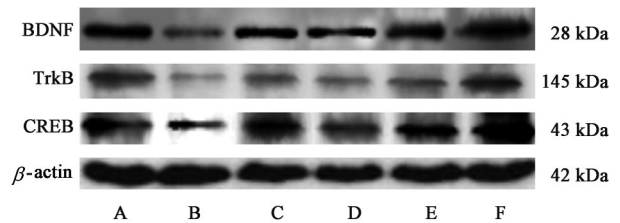


图3 大鼠海马BDNF, TrkB, CREB蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of BDNF, TrkB, CREB protein expression in hippocampus of rats

的BDNF水平会降低抑郁样行为<sup>[25]</sup>。研究显示, BDNF和TrkB缺陷小鼠对抗抑郁药没有反应, 前脑中BDNF缺乏也会导致实验动物悬尾实验行为缺陷, 并且BDNF基因敲除小鼠存在明显抑郁样行为<sup>[26-27]</sup>。“伤寒八九日, 下之, 胸满, 烦, 惊, 小便不利, 谵语, 一身尽重, 不可转侧者, 柴胡加龙骨牡蛎汤主之”。其中胸满为胸闷感, 表现为呼吸困难; 烦指睡眠障碍, 情绪不稳定; 惊为惊恐不安, 为多恶梦, 或为惊悸; 谵语, 多为精神障碍; 一身尽重, 或为木僵状, 或为行动迟缓, 或为意欲低下, 或为反应迟钝。柴胡加龙骨牡蛎汤为小柴胡汤去甘草加龙骨、牡蛎、桂枝、茯苓、大黄等诸药而成, 小柴胡汤和解枢

表8 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马组织BDNF, TrkB, CREB蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 8 Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Tang on expression of BDNF, TrkB, CREB protein in hippocampus of depressed rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	BDNF/ $\beta$ -actin	TrkB/ $\beta$ -actin	CREB/ $\beta$ -actin
空白		1.07±0.03	1.03±0.06	1.01±0.05
模型		0.51±0.04 <sup>1)</sup>	0.57±0.11 <sup>1)</sup>	0.61±0.04 <sup>1)</sup>
盐酸氟西汀	0.003	1.01±0.09 <sup>2)</sup>	0.88±0.02 <sup>2)</sup>	0.74±0.06 <sup>2)</sup>
柴胡加龙骨牡蛎汤	1.625	0.60±0.13 <sup>2)</sup>	0.64±0.11 <sup>2)</sup>	0.69±0.10 <sup>2)</sup>
	3.25	0.92±0.08 <sup>2)</sup>	0.83±0.12 <sup>2)</sup>	0.75±0.02 <sup>2)</sup>
	6.5	1.04±0.05 <sup>2)</sup>	0.86±0.08 <sup>2)</sup>	0.93±0.03 <sup>2)</sup>

机,扶正祛邪;加龙牡重镇坠痰止烦惊;加桂枝取其通阳透达以除身重,助茯苓畅利三焦、宁心安神;加少量大黄泻热和胃止谵语;去甘草,不欲其甘缓以妨祛邪也。最新研究表明柴胡加龙骨牡蛎汤中的组方药物有效成分能有效改善抑郁导致的行为学异常<sup>[28-30]</sup>,如黄芩总黄酮成分能明显缩短抑郁实验小鼠在强迫游泳实验的不动时间、悬尾不动时间;龙骨、牡蛎、桂枝、茯苓、大黄均能提高慢性应激大鼠的旷场实验水平运动及垂直运动、改善抑郁造成的快感缺失;人参皂苷Rg<sub>1</sub>可使抑郁大鼠游泳不动时间显著减少、糖水偏嗜率明显提高。本研究分别于造模前、造模后、给药后进行体质量测定、糖水偏嗜率测定、旷场实验、悬尾实验、强迫游泳实验,以验证各给药组抗抑郁效果。结果发现,经盐酸氟西汀、柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组干预后,抑郁大鼠在给药后体质量均有所增加,糖水偏嗜实验中的糖水偏嗜率,旷场实验中水平得分、垂直得分均显著增加,悬尾实验不动时间、强迫游泳实验漂浮时间均显著减少,说明盐酸氟西汀、柴胡加龙骨牡蛎汤可通过抵抗慢性应激造成的欢欣感缺失、进食减少从而发挥抗抑郁作用。

抑郁症的神经营养假说证明BDNF可能介导抗抑郁药的临床作用,并参与突触可塑性、神经元回路形成和神经元存活,因此,营养神经,保护海马神经元,促进细胞修复、重塑、再生,恢复神经营养因子和神经递质功能应该是开发抗抑郁治疗的新方向<sup>[31]</sup>。有直接证据表明柴胡加龙骨牡蛎汤能通过延缓抑郁大鼠海马BDNF水平的下调,加强海马神经元的修复、再生,从而保护海马神经元,并且逆转HPA轴功能,发挥抗抑郁作用<sup>[32-35]</sup>。本研究各组大鼠海马组织HE染色后发现,经盐酸氟西汀、柴胡加龙骨牡蛎汤各剂量组干预后,抑郁大鼠海马锥体细胞排列规整,偶有胞核深染,细胞体积较大,表明盐酸氟西汀、柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁机制可能与改善海马锥体细胞的形态、结构与分布,改善并调节

海马神经元可塑性有关。

BDNF与抑郁发生的相关研究大多还是围绕于脑源性神经营养因子、脑源性神经营养因子前体及成熟型脑源性神经营养因子之间开始开展的<sup>[36]</sup>,最近的动物研究表明,长期暴露于压力源会显著降低海马体中BDNF的表达<sup>[37]</sup>,BDNF在维持大脑功能方面发挥着的关键作用,使其成为治疗神经精神障碍疾病(包括抑郁症)的药物治疗靶点<sup>[38-39]</sup>。慢性抗抑郁药治疗会激活大脑不同区域的BDNF mRNA和蛋白质表达<sup>[40-41]</sup>,而用抗抑郁药进行预处理可防止压力引起的海马BDNF表达降低<sup>[42]</sup>。此外,TrkB受体也已被证明与抗抑郁治疗有关<sup>[43]</sup>。有学者进一步研究发现与抗抑郁密切相关的选择性5-HT再摄取抑制剂,例如氟西汀是通过BDNF/TrkB,磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt),蛋白激酶A(PKA)/CREB/BDNF, BDNF/细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)等细胞信号通路发挥抗抑郁作用的<sup>[44-45]</sup>,故单因素与抑郁症之间关系的研究对于全面揭示抑郁症的发生机制可能存在一定的局限性。也有动物实验表明BDNF可以通过神经元中的蛋白激酶C $\zeta$ (PKC $\zeta$ )/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)/BDNF/TrkB/CREB信号激活有丝分裂原活化蛋白激酶(AMPK)级联介导的海马神经发生产生抗抑郁作用<sup>[46]</sup>。不仅如此,BDNF还可使其受体TrkB磷酸化激活Ras-细胞外信号调节激酶(Ras)/ERK,磷脂酶- $\gamma$ (PLC- $\gamma$ )和PI3K/Akt通路,活化的PLC- $\gamma$ 直接诱导钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CaMK II)激活转录因子CREB从而增加BDNF表达<sup>[47]</sup>。因此,基于BDNF细胞信号通路探讨药物干预抑郁症的机制就显得尤为重要。现中药干预抑郁症中的BDNF相关信号通路主要有细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)/CREB/BDNF通路, CaMK II /CREB/BDNF通路,一氧化氮(NO)/CREB/BDNF通路,腺苷酸环化酶(AC)/环磷酸腺苷(cAMP)/PKA/CREB/BDNF, BDNF/TrkB/ERK1/2/CREB通路, BDNF/TrkB/丝裂

原活化蛋白激酶激酶(MEK)/ERK/NF- $\kappa$ B通路, BDNF/TrkB/PI3K/Akt/CREB通路等<sup>[48]</sup>。其中柴胡加龙骨牡蛎汤组方药物有效成分可有效改善细胞信号通路异常<sup>[48-50]</sup>,如人参皂苷Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>1</sub>和Re抗抑郁作用机制可能与调节神经营养因子细胞信号转导通路上游的CaMK II/CREB通路有关;柴胡皂苷B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>能通过影响BDNF, NGF和mRNA的受体的表达发挥抗抑郁作用;大黄酚的抗抑郁作用与影响BDNF/TrkB/MEK/ERK/NF- $\kappa$ B信号通路有关;半夏有效成分能通过降低肝组织中一氧化氮合酶活性,影响NO/CREB/BDNF信号通路发挥抗抑郁作用。本研究结果发现,经盐酸氟西汀,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组干预后,抑郁大鼠海马免疫组织化学染色显示BDNF表达水平显著升高及IHC评分显著增加,Real-time PCR显示BDNF, TrkB, CREB mRNA表达明显增加,Western blot检测显示BDNF, TrkB, CREB蛋白表达明显增加,表明柴胡加龙骨牡蛎汤可能是通过上调抑郁大鼠海马BDNF, TrkB, CREB水平参与的抗抑郁过程。

综上所述,柴胡加龙骨牡蛎汤具有剂量依赖性的抗抑郁作用,可改善抑郁样行为,改善海马神经元可塑性,其机制可能与上调BDNF/TrkB/CREB信号转导通路有关,但关于该方发挥主要抗抑郁作用的药物以及全方的内在抗抑郁机制还有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] ORMEL J, HARTMAN C A, SNIEDER H. The genetics of depression: successful genome-wide association studies introduce new challenges [J]. *Transl Psychiatry*, 2019, 9(1): 114.

[2] LEDFORD H. Medical research: if depression were cancer[J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 182-184.

[3] KNOL M J, TWISK J W R, BEEKMAN A T F, et al. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A Meta-analysis[J]. *Diabetologia*, 2006, 49(5): 2799-2800.

[4] MASSART R, MONGEAU R, LANFUMEY L. Beyond the mono-aminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012, 367(1601): 2485-2494.

[5] 尹营营,袁勇贵. 抑郁症的遗传学研究进展[J]. *临床精神医学杂志*, 2014, 24(4): 277-278.

[6] 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*, 2021, 26(6): 243-250.

[7] 琚李亮,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): 1008-8849.

[8] YAN T, XU M, WAN S, et al. 2016. Schisandra chinensis produces the antidepressant-like effects in repeated corticosterone-induced mice via the BDNF/TrkB/CREB signaling pathway [J]. *Psychiatry Res*, 243, 135-142.

[9] 李玥,贺敏,张磊阳,等. 抗抑郁药物的研究进展[J]. *临床药物治疗杂志*, 2017, 15(1): 1672-3384.

[10] 邹锦. 张仲景方辨治抑郁症的文献研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.

[11] 汤艳莉,王继明,庄庭怡,等. 柴胡加龙骨牡蛎汤加味治疗轻中度原发性高血压合并抑郁肝阳上亢证的临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(13): 1005.

[12] 张有志,聂惠民,付延龄,等. 柴胡加龙骨牡蛎汤等经方治疗抑郁症的动物行为学研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 7(7): 510-512.

[13] 杨洁,瞿融. 基于抗抑郁作用的柴胡加龙骨牡蛎汤的研究进展[J]. *贵阳中医学院学报*, 2012, 34(6): 39-41.

[14] 李佳. 近5年柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁作用研究进展[J]. *中医药临床杂志*, 2015, 27(8): 1175-1178.

[15] 张建翔. 柴胡龙骨牡蛎汤加减治疗对抑郁障碍患者负性情绪的影响[J]. *现代医学与健康研究*, 2021, 5(13): 2096.

[16] LIU W, XUE X, XIA J, et al. Swimming exercise reverses CUMS-induced changes in depression-like behaviors and hippocampal plasticity-related proteins [J]. *Affect Disord*, 2018, 227: 126-135.

[17] 李宇,蔡萧君,王钦,等. 巴戟天对慢性应激大鼠肠道微生物代谢多样性的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, doi:10.19879/j.cnki.1005-5304.202105455.

[18] 颜彦鹏. 基于5-HT<sub>2A</sub>R、CaMK II  $\alpha$ 表达变化研究柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁机制[D]. 哈尔滨: 黑龙江省中医药科学院, 2020.

[19] VOLLMEYER B, HENN F A. Stress models of depression [J]. *Clin Neurosci Res*, 2003, 3: 245-251.

[20] BONDI C O, RODRIGUEZ G, GOULD G G, et al. Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33: 320-31.

[21] ZHANG C, ZHANG Y P, LI Y Y. Minocycline ameliorates depressive behaviors and neuro-immune dysfunction induced by chronic unpredictable mild stress in the rat [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 356, 348-357.

[22] 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*, 1997, 93: 358-364.
- [23] KATZ R J, ROTH K A, CARROL B J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5: 247-251.
- [24] CRYAN J F, VALENTINO R J, LUCKI I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, 29: 547-569.
- [25] PARK S E, DANTZER R, KELLEY K W, et al. Central administration of insulin-like growth factor-I decreases depressive-like behavior and brain cytokine expression in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, doi:10.1186/1742-2094-8-12.
- [26] AKIHIKO W. Lithium and neuropsychiatric therapeutics: neuroplasticity via glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin, and neurotrophin cascades [J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 110: 14-28.
- [27] MARTINOWICH K, MANJI H, LU B. New insights into BDNF function in depression and anxiety [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10: 1089-1093.
- [28] 齐卫卫, 钟正灵, 郭亚鹏, 等. BDNF 信号通路在天然抗抑郁药中的研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2016, 21(9): 1068-1073.
- [29] 王金梦, 杨玉, 刘星玥, 等. 基于信号通路的中药抗抑郁作用机制研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(1): 1673-7717.
- [30] 杨节, 沈莉. 柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁研究进展 [J]. *CJCM 中医临床研究*, 2019, 11(8): 1674-7860.
- [31] LI L F, LU J, LI X M, et al. Antidepressant-like effects of the saponins extracted from *Chaihu-jia-longgu-mulitang* in a rat unpredictable chronic mild stress model [J]. *J Fitoterapia*, 2012, doi: 10.1016/j.fitote.2011.09.017.
- [32] 王晓滨, 孔明月, 孙荣华, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对慢性应激抑郁大鼠行为及海马形态学的影响 [J]. *中医药信息*, 2014, 31(3): 50-52.
- [33] 张磊阳, 蒋健, 贺敏, 等. 抗抑郁中药的药理研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(24): 224-234.
- [34] 康大力, 瞿融, 朱维莉, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁动物下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(11): 1231-1235.
- [35] 王晓滨, 孙荣华, 胡继平, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对慢性应激抑郁大鼠海马 BDNF 表达的影响 [J]. *中医药学报*, 2014, 42(3): 143-145.
- [36] 王娜, 黄芹, 鲍天昊, 等. 神经营养因子假说与抑郁症发病机制的研究进展 [J]. *四川精神卫生*, 2019, 32(1): 1007-3256.
- [37] SMITH M A, MAKINO S, KVETNANSKY R, et al. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus [J]. *J Neurosci*, 1995, 15 (Pt1): 1768-1777.
- [38] ROSSI C, ANGELUCCI A, COSTANTIN L. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment [J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 24: 1850-1856.
- [39] AUTRY A E, MONTEGGIA L M. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64: 238-258.
- [40] ALTAR C A. Neurotrophins and depression [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1999, 20: 59-61.
- [41] DIAS B G, BANERJEE S B, DUMAN R S, et al. Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain [J]. *Neuropharmacology*, 2003, 45: 553-563.
- [42] NIBUYA M, MORINOBU S, DUMAN R S. Regulation of BDNF and TrkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments [J]. *J Neurosci*, 1995, 15: 7539-7547.
- [43] DWIVEDI Y. Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2009, 5: 433-449.
- [44] 曾冰清. PI3K/Akt/FoxO3a 信号通路和 PKA/CREB 信号通路在氟西汀保护皮质酮诱导 PC12 细胞损伤中的作用 [D]. 广州: 南方医科大学, 2016.
- [45] 包玲, 胡晓华, 王宗琴, 等. 运动联合抗抑郁药物对大鼠海马细胞和 BDNF/pERK 信号通路的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(20): 14-19.
- [46] ODAIRA T, NAKAGAWASAI O, TAKAHASHI K, et al. Mechanisms underpinning AMP-activated protein kinase-related effects on behavior and hippocampal neurogenesis in an animal model of depression [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 150: 121-133.
- [47] LEE Y J, KIM H R, LEE C Y, et al. 2-Phenylethylamine (PEA) ameliorates corticosterone-induced depression-like phenotype via the BDNF/TrkB/CREB signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9103.
- [48] 齐卫卫, 钟正灵, 郭亚鹏, 等. BDNF 信号通路在天然抗抑郁药中的研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2016, 21(9): 1068-1073.
- [49] 王金梦, 杨玉, 刘星玥, 等. 基于信号通路的中药抗抑郁作用机制研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(1): 1673.
- [50] 杨节, 沈莉. 柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁研究进展 [J]. *中医临床研究*, 2019, 11(8): 1674-7860.

[责任编辑 孙丛丛]