

柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马NLRP3通路的免疫调节作用

尚立芝^{1,2}, 毛梦迪^{1,2}, 许二平^{1,2*}, 张明远¹, 周春雨^{1,2}, 王国强^{1*}, 李耀洋¹, 刘保光^{1,2},
白明^{1,2}, 栗俞程^{1,2}, 汪保英^{1,2}, 陈晓辉¹

(1. 河南中医药大学中医药科学院, 第一临床医学院, 基础医学院, 郑州 450046;
2. 河南省仲景方药现代研究重点实验室, 郑州 450046)

[摘要] 目的:探讨柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体通路的作用及其机制。方法:60只雄性SD大鼠随机平均分为6组,分别为正常组、模型组、柴胡加龙骨牡蛎汤高、中、低剂量组,NLRP3抑制剂(MCC950)组。除正常组外,其余采用孤养联合慢性不可预见性应激(CUMS)21 d,制备抑郁大鼠模型。柴胡加龙骨牡蛎汤高、中、低组分别灌胃13,6.5,3.25 g·kg⁻¹柴胡加龙骨牡蛎汤溶液,MCC950组腹腔注射1 mg·kg⁻¹,正常组、模型组灌胃等体积生理盐水,给药21 d期间持续追加造模。采用糖水偏好实验(SPT)和新奇摄食实验评价大鼠的抑郁行为,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测海马组织匀浆中白细胞介素-1 β (IL-1 β)和IL-18含量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组大鼠海马中NLRP3,凋亡相关微粒蛋白(ASC)及半胱氨酸天门冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组糖水偏好率显著降低($P<0.01$),新奇摄食时间显著延长($P<0.01$);海马组织中NLRP3,ASC,Caspase-1蛋白表达显著增强($P<0.01$),IL-1 β 和IL-18水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤高、中组糖水偏好率显著提高($P<0.01$),新奇摄食时间显著缩短($P<0.01$);海马中NLRP3,ASC,Caspase-1蛋白表达明显减弱($P<0.05$, $P<0.01$),IL-1 β 和IL-18水平显著降低($P<0.01$)。结论:柴胡加龙骨牡蛎汤可减轻CUMS诱导的抑郁行为,其机制可能与抑制NLRP3炎症小体通路有关。

[关键词] 抑郁症;柴胡加龙骨牡蛎汤;炎症;海马;NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)24-0033-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202303

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201028.1131.002.html>

[网络出版日期] 2020-10-28 14:55

Immunoregulatory Effect of Chaihu Jia Longgu Mulitang Modified with Bupleuri Radix on Hippocampal NLRP3 Pathway in Depressed Rats

SHANG Li-zhi^{1,2}, MAO Meng-di^{1,2}, XU Er-ping^{1,2*}, ZHANG Ming-yuan¹, ZHOU Chun-yu^{1,2},
WANG Guo-qiang^{1*}, LI Yao-yang¹, LIU Bao-guang^{1,2}, BAI Ming^{1,2}, LI Yu-cheng^{1,2},
WANG Bao-ying^{1,2}, CHEN Xiao-hui¹

(1. Academy of Chinese Medical Sciences, School of Basic Medical Science, The First Clinical School of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Henan Key Laboratory for Modern Research of Zhongjing Compound Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[收稿日期] 20200827(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973739);河南省高等学校重点科研项目(20B360011,21A630020);河南省教育科学“十三五”规划一般课题([2019]-JKGHYB-0101,[2019]-JKGHYB-0114);国家级大学生创新创业训练计划项目(202010471016,202010471003);河南省中医药科学研究专项课题(2019JDZX2121,2019ZY3048)

[第一作者] 尚立芝,硕士,教授,硕士生导师,从事中医药作用机制研究,Tel:0371-86253082,E-mail:lzshang2014@163.com

[通信作者] *许二平,博士,教授,博士生导师,从事仲景方药现代研究,Tel:0371-65680003,E-mail:xuerping@sina.com;

*王国强,博士,助理研究员,从事中医药对免疫性疾病作用机制研究,Tel:0371-86253082,E-mail:biowgq@126.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Chaihu Jia Longgu Mulitang (CJLM) on hippocampal NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome pathway in rats with depression. **Method:** Sixty male SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, a MCC950 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and high- ($13 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), medium- ($6.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and low-dose ($3.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Chaihu Jia Longgu Mulitang groups, with 10 rats in each group. The depression model was induced by isolation combined with chronic unpredictable mild stimulation (CUMS) in rats except for those in the normal group. Rats were treated correspondingly for 21 days by intraperitoneal injection in the MCC950 group and gavage in other groups. The normal group and the model group received an equal volume of normal saline. The depression-like behaviors of rats were observed by sucrose preference test (SPT) and novelty-suppressed feeding test. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of interleukin- 1β (IL- 1β) and IL-18 in the hippocampus of depressed rats. Western blot was used to detect the protein levels of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain (ASC), and Caspase-1. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed decreased sucrose preference rate ($P < 0.01$), prolonged novelty-suppressed feeding time ($P < 0.01$), enhanced protein expression of NLRP3, ASC, and caspase-1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and elevated expression of IL- 1β and IL-18 ($P < 0.01$). **Conclusion:** CJLM can alleviate depression-like behaviors in CUMS-induced model rats, and the underlying mechanism is related to the inhibition of the NLRP3 inflammasome pathway.

[Keywords] depression; Chaihu Jia Longgu Mulitang; inflammation; hippocampus; NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome

抑郁症是以持久情绪低落、思维迟缓及活动减少等为核心症状的精神神经综合征^[1]。因其高发病率、高复发率、高疾病负担及高自杀率而备受关注^[2]。目前,抑郁症的发病机制不清,主要有神经递质紊乱、免疫炎症、内分泌失调、神经元适应性和可塑性损害、氧化应激和线粒体功能障碍等学说^[3],其中免疫功能紊乱所致的炎症反应是抑郁症发病的关键机制之一^[4]。炎症小体主要存在于固有免疫细胞,中枢神经系统的小胶质细胞,外周的巨噬细胞和树突状细胞中^[5]。目前已知炎症小体有4种,其中NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体已被认为是潜在的抑郁症炎症标志物之一^[6]。NLRP3炎症小体是由识别受体NOD样家族样结构域NLRP3,凋亡相关微粒蛋白(ASC)及半胱氨酸天门冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)组成的复合物;免疫细胞识别心理应激所致的NLRP3炎症小体的激活,诱导小胶质细胞合成并释放白细胞介素- 1β (IL- 1β)和IL-18,诱发中枢神经的炎症损伤,导致神经递质的改变以及抑郁样行为的出现^[6-7]。研究证实,CUMS可以诱导大鼠海马小胶质细胞中NLRP3炎症小体的激活^[8-9]。NLRP3炎症小体不仅参与抑郁症的发病机制,而且可能是抑郁症干预的新的分子靶标^[10-11]。

抑郁症属中医学“情志病”“心病”“郁证”“脏躁”等范畴。本病主要病位在肝,累及心、脾、肾,主

要病机为肝失疏泄。临床上主要采用疏肝解郁的治法。柴胡加龙骨牡蛎汤出自张仲景《伤寒论》,该方药可和解少阳,通阳泻热,重镇安神,控制神经系统疾病的发作,临床及实验研究均表明柴胡加龙骨牡蛎汤具有很好的抗抑郁作用^[12-13]。但柴胡加龙骨牡蛎汤是否通过抑制海马免疫细胞中NLRP3炎症小体通路而对抗抑郁症。目前报道较少,有待深入研究。

本研究采用孤养联合慢性不可预见性应激(CUMS)制备大鼠抑郁模型,通过Morris水迷宫和新奇摄食实验,评价柴胡加龙骨牡蛎汤对大鼠抑郁行为的影响,证实柴胡加龙骨牡蛎汤对海马免疫细胞中NLRP3炎症小体通路关键分子的抑制作用,以揭示柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁症免疫功能的调节作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 健康SD雄性大鼠,SPF级,6周龄,体重(200±20)g,购自河南省实验动物中心,实验动物合格证号SCXK(豫)2017-0001,动物质量合格证号41003100006058。动物饲料购自河南省实验动物中心,河南省实验动物饲料A级,合格证号SCXK(豫)2015-0005,动物饲料质量合格证号41000100004370。自购买之日起,动物饲养于河南中医药大学中医药科学院动物实验中心的SPF动物实验室,

实验动物使用许可证号SYXK(豫)2015-0005。孤立饲养,环境温度为20~26℃,湿度为40%~60%,适应性喂养7 d。动物实验方案获得河南中医药大学实验动物伦理委员会审核,该实验动物的伦理审查批准编号DWLL17010032。实验过程中对动物的处置符合2006年国家科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 药物及试剂 柴胡加龙骨牡蛎汤组成:柴胡12 g(批号18051111),龙骨4.5 g(批号17121671),黄芩4.5 g(批号18081431),生姜4.5 g(批号18021811),人参4.5 g(批号1701120),桂枝(去皮)4.5 g(批号18020081),茯苓4.5 g(批号18041411),半夏6 g(洗)(批号18032321),大黄6 g(批号18061591),牡蛎4.5 g(批号1702189),以上均为江阴天江药业有限公司产品。NLRP3抑制剂(MCC950,北京百奥莱博科技有限公司,批号03317);IL-1 β 大鼠酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海恒远生物有限公司,批号20171335);IL-18大鼠ELISA试剂(武汉华美生物技术有限公司,批号CSB-EO4610r);兔抗大鼠NLRP3(美国Santa Cruz公司,批号sc-7302);兔抗大鼠Caspase-1(美国Bioworld公司,批号CJ44121);羊抗大鼠ASC(美国Abcam公司,批号ab175450);兔抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,美国Sigma-Aldrich公司,批号G8795);辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白(Ig)G山羊抗兔二抗,兔抗山羊二抗(美国Abnova公司,批号分别为301005,20162548);BCA蛋白定量试剂盒,RIPA裂解液,超敏ECL发光剂,彩色预染蛋白质相对分子质量Maker,蛋白酶(上海威奥生物科技有限公司,批号分别为WB0125, WB0101, WB2164, WB0173, WB0122)。

1.3 仪器 Powerwave XS型波长扫描酶标仪(美国BioTek公司),DU640型紫外分光光度计(美国Beckman公司),Mini Trans型电泳仪(美国Bio-Rad公司),anon-2500型全自动凝胶成像系统(上海天能公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药 从60只SD大鼠中,随机数字表法选取10只作为正常组,对该组不给予应激刺激,每天捉拿1次。其余50只用于造模,采用CUMS制备大鼠抑郁模型,冰水游泳(4℃,5 min),电击足底(电流强度1 mA,电压60 mV,10 s/次,间隔1 min刺激1次,共5次)、夹尾(距尾根1 cm,3 min),禁食(24 h),热水浴(42℃,持续5 min),禁

水(24 h),昼夜颠倒(如持续黑暗24 h或持续光照24 h),束缚(24 h),潮湿垫料(24 h)。不同刺激在实验全过程中的顺序随机应用,每天给予1种刺激,相邻2 d相同刺激不重复,使大鼠不可预见刺激的发生,同时配合单笼饲养,共刺激42 d^[14]。第21天将造模大鼠随机分为模型组、柴胡加龙骨牡蛎汤高、中、低剂量组,MCC950组,每组10只。从第22天起,除正常组外,另5组均继续接受CUMS,于刺激1 h之前灌胃。MCC950组腹腔注射10 mg·kg⁻¹^[15-16],柴胡加龙骨牡蛎汤高、中、低剂量组分别灌胃13, 6.5, 3.25 g·kg⁻¹;为避免给药途径对精神状态的影响,正常组、模型组、MCC950组灌胃蒸馏水6.5 g·kg⁻¹;正常组、模型组,以及柴胡加龙骨牡蛎汤高、中、低剂量组还分别腹腔注射生理盐水10 mg·kg⁻¹,均1次/d。

2.2 行为学检测

2.2.1 糖水偏好实验(SPT) 禁水禁食24 h后,给予食物,每笼孤养的大鼠给予的2个水瓶,外观完全相同,且液体容积均200 mL;其中1瓶纯净水,另1瓶1%蔗糖水,每隔12 h调换1次水瓶位置,24 h后,测量糖水和纯净水1 h内的消耗量,计算大鼠的糖水偏好率,糖水偏好率=糖水消耗量(mL)/总液体消耗量(mL)×100%。

2.2.2 新奇摄食实验 禁食、不禁水24 h后,将大鼠面向箱壁从同一位置放入实验箱中,实验箱规格为75 cm×75 cm×75 cm,箱中心放入适量等体积食物,适应30 s后,观察并记录大鼠5 min内首次咀嚼食物的时间。

2.3 ELISA检测海马匀浆中IL-1 β 和IL-18含量

以10%水合氯醛麻醉大鼠,冰上快速取脑,分离海马,放入离心管,置于液氮转至-80℃冰箱。取出大鼠海马组织,制备海马匀浆,离心3 000 r·min⁻¹,4℃离心10 min(离心半径10 cm),取上清。采用ELISA法检测IL-18, IL-1 β 的含量,用酶标仪,在450 nm波长下测定吸光度A,由标准曲线计算大鼠海马匀浆中IL-18, IL-1 β 含量。严格按照ELISA试剂盒说明书操作进行。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马匀浆中NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白表达 从-80℃冰箱取出大鼠另一侧海马组织,在液氮中研磨后,迅速加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA蛋白裂解液充分裂解。用超声破碎仪匀浆60 s,频率50 Hz。12 000 r·min⁻¹,4℃,离心15 min,取上清。提取总蛋白,BCA法检测蛋白浓度,并计算出

所需的蛋白量。取蛋白样品加入5×蛋白上样缓冲液,100℃加热,变性10 min。配制分离胶和浓缩胶,上样电泳,转膜,室温封闭2 h。1×TBST洗膜5 min。加一抗:兔抗大鼠NLR3P(1:500),兔抗大鼠Caspase-1(1:500),山羊抗大鼠ASC(1:500),兔抗大鼠抗GAPDH(1:1 000),4℃,孵育过夜。然后用1×TBST洗膜3次,每次10 min,加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000),室温孵育2 h,洗膜3次,每次10 min,ECL发光,采用Experion全自动电泳系统完成成像、条带检测、定量及数据分析。

2.5 统计学处理 应用统计软件SPSS 25.0进行数据分析,定量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 描述,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 糖水偏好率及新奇摄食实验评价造模21 d大鼠的抑郁行为 应激刺激21 d后,与正常组比较,模型组糖水偏好率显著减低($P<0.01$),新奇摄食时间显著延长($P<0.01$);与模型组比较,糖水偏好率及新奇摄食在柴胡加龙骨牡蛎汤的低、中、高剂量组及MCC950组的组间比较均无显著性差异。见表1。

表1 造模21 d(给药前)大鼠糖水偏好率及新奇摄食行为的评价($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Evaluation of sucrose preference test (SPT) and novel feeding behaviors result of each group, after 21 days modeling ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	糖水偏好率/%	新奇摄食时间/s
正常		27.41±4.32	134.61±32.51
模型		13.46±3.23 ²⁾	256.31±31.53 ²⁾
柴胡加龙骨牡蛎汤	3.25	14.21±3.42	251.46±24.43
	6.50	13.51±3.32	261.46±23.51
	13.00	13.44±3.12	254.36±32.45
MCC950	0.01	14.51±3.45	249.72±32.16

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

3.2 对抑郁大鼠糖水偏好率及新奇摄食行为的影响 给药21 d后,与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤高、中剂量组糖水偏好率显著增高($P<0.01$),新奇摄食时间显著缩短($P<0.01$)。见表2。

3.3 对抑郁大鼠海马匀浆中IL-1 β 和IL-18水平的影响 与正常组比较,模型组海马中IL-1 β 和IL-18显著升高($P<0.01$);与模型组相比较,MCC950和柴胡加龙骨牡蛎汤高、中剂量组海马中IL-1 β 和IL-18均显著降低($P<0.01$)。见表3。

表2 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠糖水偏好率及新奇摄食行为的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Chaihu Jia Longgu Multang on sucrose preference test and novel feeding behaviour result of each group depression rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	糖水偏好率/%	新奇摄食时间/s
正常		30.53±4.61	136.54±31.23
模型		15.56±3.57 ²⁾	398.46±35.29 ²⁾
柴胡加龙骨牡蛎汤	3.25	23.26±3.21 ³⁾	309.44±34.41 ³⁾
	6.50	26.48±3.37 ⁴⁾	143.46±33.38 ⁴⁾
	13.00	27.51±3.35 ⁴⁾	150.53±23.24 ⁴⁾
MCC950	0.01	28.73±4.26 ⁴⁾	157.31±23.28 ⁴⁾

表3 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马匀浆中IL-1 β 和IL-18含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Chaihu Jia Longgu Multang on levels of IL-1 β and IL-18 in hippocampus tissue of depression rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-18
正常		70.12±22.35	52.59±21.55
模型		237.51±32.23 ²⁾	136.41±15.56 ²⁾
柴胡加龙骨牡蛎汤	3.25	228.67±33.12	131.59±14.78
	6.50	155.42±27.58 ⁴⁾	84.89±5.37 ⁴⁾
	13.00	125.46±24.35 ⁴⁾	75.83±6.24 ⁴⁾
MCC950	0.01	108.41±23.12 ⁴⁾	62.75±5.43 ⁴⁾

3.4 对抑郁大鼠海马匀浆中NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组海马中NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,MCC950和柴胡加龙骨牡蛎汤高、中剂量组海马中NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白表达均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表4,图1。

4 讨论

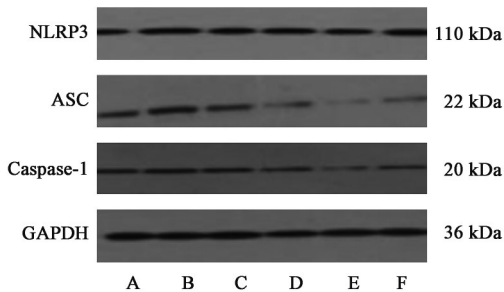
抑郁症是一种常见的情感障碍性精神疾病,主要表现为情绪低落、食欲不振、睡眠障碍、消瘦乏力等,这些症状可能会长期或反复发作,严重者甚至有自杀倾向^[1]。抑郁症属中医学“情志病”“郁证”“脏躁”等范畴。本病主要病位在肝,累及心、脾、肾,主要病机为肝失疏泄,气机不畅,气郁生湿,湿则生痰,痰凝气滞,血郁化火。柴胡加龙骨牡蛎汤由柴胡、龙骨、牡蛎、黄芩、生姜、人参、半夏、茯苓、桂枝、大黄、大枣、铅丹(铅丹有毒,药房多不备)组成。方中诸药共奏和解少阳,通阳泻热,重镇安神之功^[12-13]。

CUMS被广泛应用于抑郁症的病理机制与药

表 4 柴胡加龙骨牡蛎汤对海马中 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Chaihu Jia Longgu Mulitang on expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 protein in hippocampus of depression rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NLRP3/GAPDH	ASC/GAPDH	Caspase-1/GAPDH
正常		0.45±0.05	0.37±0.03	0.71±0.11
模型		1.51±0.13 ²⁾	1.22±0.15 ²⁾	1.35±0.12 ²⁾
柴胡加龙骨牡蛎汤	3.25	1.15±0.12	1.12±0.14	1.33±0.13
	6.50	0.81±0.18 ⁴⁾	0.65±0.12 ³⁾	0.75±0.12 ⁴⁾
	13.00	0.75±0.12 ⁴⁾	0.42±0.14 ⁴⁾	0.73±0.13 ⁴⁾
MCC950	0.01	0.71±0.13 ⁴⁾	0.45±0.13 ⁴⁾	0.75±0.12 ⁴⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 柴胡加龙骨牡蛎汤 3.25 g·kg⁻¹组; D. 柴胡加龙骨牡蛎汤 6.5 g·kg⁻¹组; E. 柴胡加龙骨牡蛎汤 13 g·kg⁻¹组; F. MCC950 组

图 1 各组大鼠海马中 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 蛋白表达的影响电泳

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

效药理研究^[17]。本实验采用孤养联合 CUMS 应激制备大鼠抑郁模型。行为学检测选用糖水偏好实验(SPT)及新奇摄食实验,评价大鼠的对甜味的偏好和自发性探索行为的能力,结果显示,与正常组比较,模型组糖水偏好率显著减低、新奇摄食时间延长。表明模型组大鼠体验快乐的能力下降甚至快感缺失,自主活动能力降低,兴趣丧失、食欲下降、活动减少等典型的抑郁行为,对外界环境的探索能力下降,与文献报道相近^[18],是精神疾病及行为障碍的重要特征,提示孤养联合 CUMS 刺激造模成功。

海马免疫细胞中 NLRP3 炎症小体通路的激活参与抑郁发病机制^[8-9]。研究显示免疫细胞未接受刺激时,ASC 位于胞核^[19];免疫细胞通过损伤相关的分子模式(DAMPs)识别心理的压力所致的免疫激活,使 ASC 由胞核转位到胞浆,诱导 NLRP3 炎症小体的热蛋白结构域与 ASC 结合,招募 pro-Caspase-1 通过自切割,产生活化的 Caspase-1, Caspase-1 再切割并加工下游的 IL-1 β 前体(pro-IL-1 β) 和 IL-18 前体(pro-IL-18)成熟为 IL-1 β 和 IL-18,并释

放致胞外^[19-21]; IL-1 β 和 IL-18 激活核转录因子- κ B (NF- κ B)通路,活化的 NF- κ B 转入核内,启动下游基因的转录,合成并释放更多的细胞因子,如 IL-1 β , IL-18, IL-6, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症介质,如此形成恶性循环^[22]。本实验孤养联合 CUMS 诱导抑郁大鼠模型,与正常组比较,模型组海马中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白表达显著升高,海马中 IL-1 β 和 IL-18 亦显著升高,说明模型组接受激活 NLRP3 炎症小体,活化 NLRP3 炎症小体使 IL-1 β 和 IL-18 大量成熟并释放, IL-1 β 和 IL-18 再激活 NLRP3 炎症小体,循环引起炎症反应,诱导神经元和胶质细胞的细胞焦亡或凋亡^[23-24],使脑内 5-HT 下降,诱导抑郁行为^[25]。提示 CUMS 诱发 NLRP3 炎症小体的激活,活化 NLRP3 炎症小体参与了抑郁症的发病过程。

柴胡加龙骨牡蛎汤通过抑制 NLRP3 免疫通路发挥对抑郁症的抗炎作用。研究发现抑郁症患者外周血单核细胞中 NLRP3 活化, IL-1 β , IL-18, IL-6, CRP, TNF- α 等炎症介质水平增高,细胞因子水平与抑郁症的严重程度密切相关^[10];而接受抗抑郁治疗后 NLRP3, Caspase-1, IL-1 β 和 IL-18 的 mRNA 的表达比未治疗的抑郁症患者明显减少,细胞因子水平逐渐趋于正常^[26]。抑制炎症信号通路,则可减少患者的抑郁症状^[27]。而敲除 NLRP3 基因的小鼠,即使接受长时间 CUMS 刺激,也不能成功诱导抑郁模型^[28],且在外周血中未发现 IL-1 β , IL-18 水平升高^[9]。MCC950 是 NLRP3 的抑制剂^[29], MCC950 可显著抑制外周巨噬细胞、中枢小胶质细胞中 NLRP3 炎症小体活化, Caspase-1 裂解以及 IL-1 β 的分泌,从而改善大鼠抑郁行为^[26]。本研究结果显示,治疗 21 d 后,与模型组相比较, MCC950 和柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组海马中 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 蛋白表达显著减弱, IL-18, IL-1 β 含量均显著降低,与文献报道一致^[30]。MCC950 通过抑制 NLRP3 的

通路,减少IL-1 β 和IL-18的合成与释放,阻止炎症反应的进程,抑制抑郁行为^[29]。柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组和MCC950组大鼠糖水偏好率显著提高,新奇摄食时间显著缩短,提示NLRP3炎症小体抑制剂和柴胡加龙骨牡蛎汤均可显著提高快感及食欲,改善抑郁行为。与MCC950同理,柴胡加龙骨牡蛎汤可能与MCC950对NLRP3炎症小体通路有相似的抑制作用,阻止IL-1 β 和IL-18的合成与释放,从而减轻炎症反应以及炎症对神经细胞的损伤,进而改善抑郁行为。

综上所述,抑郁模型大鼠海马存在NLRP3炎症小体通路的过度激活,以及IL-1 β 和IL-18分泌增加而诱发炎症反应;柴胡加龙骨牡蛎汤通过抑制NLRP3介导的炎症反应及神经损伤,从而发挥抗抑郁作用。NLRP3炎症小体作为固有免疫的重要组成部分,在抑郁症发病及治疗机制中发挥重要作用。

本研究将为探索抑郁症与免疫机制之间的潜在关系提供依据,同时为针对NLRP3炎症小体进的新药研发提供方向。本研究发现NLRP3炎症小体的表达水平变化可引起细胞因子的变化及相应的动物行为学改变,究竟NLRP3炎症小体是通过何种路径影响最终的动物行为学变化,目前尚不清楚;柴胡加龙骨牡蛎汤可能抑制NLRP3炎症小体活化,减弱IL-1 β 和IL-18的合成与成熟,减轻抑郁行为,其详细机制有待深入研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] VAN BEEK T A, MONTORO P. Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals [J]. *J Chromatography A*, 2009, 1216(11):2002-2032.
- [2] SMITH K. Mental health: a world of depression [J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 181.
- [3] OGLODEK E, SZOTA A, JUST M, et al. The role of the neuroendocrine and immune systems in the pathogenesis of depression [J]. *Pharmacol Rep*, 2014, 66(5): 776-781.
- [4] MICHAEL M. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2011, 35(3): 664-675.
- [5] MARTINON F, BURNS K, TSCHOPP J. The inflammasome: a molecular platform triggering

- activation of inflammatory caspases and processing of pro IL- β [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(2): 417-426.
- [6] 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, doi:10.1016/j.bbr.2020.112684.
- [7] LI C, XU X, WANG Z, et al. Exercise ameliorates post-stroke depression by inhibiting PTEN elevation-mediated upregulation of TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling in mice [J]. *Brain Res*, 2020, doi: 10.1016/j.brainres.2020.
- [8] MA X, ZHU Z, GUO S, et al. The effect of deoxyschizandrin on chronic unpredictable mild stress-induced depression [J]. *Duan J Biotechnol Appl Biochem*, 2020, doi:10.1002/bab.1893.
- [9] ZHANG Y, LIU L, LIU Y Z, et al. NLRP3 inflammasome mediates chronic mild stress-induced depression in mice via neuro inflammation [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2015, 18(8): 1-8.
- [10] ALCOCER-GOMEZ E, ULECIA-MORON C, MARIN-AGUILAR F, et al. Stress-induced depressive behaviors require a functional NLRP3 inflammasome [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(7): 4874-4882.
- [11] 唐标,唐文静,唐映红,等. 黄芪甲苷减轻大鼠脑缺血再灌损伤并抑制NF- κ B磷酸化及NLRP3炎症小体活化[J]. *生理学报*, 2019, 71(3): 424-430.
- [12] 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*, 2021, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201390.
- [13] 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): 30-32.
- [14] LIU Q, YU J, MI W L, et al. Electroacupuncture attenuates the decrease of hippocampal progenitor cell proliferation in the adult rats exposed to chronic unpredictable stress [J]. *Life Sci*, 2007, 81 (21/22) : 1489-1495.
- [15] 尚立芝,毛梦迪,许二平,等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马组织PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(23) : 12-19.
- [16] 文洋,鞠科. 丙泊酚通过NLRP3/caspase-1通路对脑缺血大鼠发挥神经保护作用[J]. *中国药师*, 2020, 23(6): 1081-1086.
- [17] BANASR M, VALENTINE G W, LI X Y, et al. Chronic unpredictable stress decreases cell

- proliferation in the cerebral cortex of the adult rat[J]. Biol Psychiatry, 2007, 62(5):496-504.
- [18] DUMAN R S. Depression: a case of neuronal life and death?[J]. Biol Psychiatry, 2004, 56(3):140-145.
- [19] JHA S, SRIVASTAVA S Y, BRICKEY W J, et al. The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via Caspase-1 and interleukin-18 [J]. J Neurosci, 2010, 30 (47) : 15811-15820.
- [20] IWATA M, OTA K T, LI X Y, et al. Psychological stress activates the inflammasome via release of adenosine triphosphate and stimulation of the purinergic type 2X7 receptor [J]. Biol Psychiatry, 2016, 80(1):12-22.
- [21] HIRSHMAN N A, HUGHES F M, JIN H, et al. Cyclophosphamide-induced cystitis results in NLRP3-mediated inflammation in the hippocampus and symptoms of depression in rats [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2020, 318(2):F354-F362.
- [22] GOLDBERG E L, ASHER J L, MOLONY R D, et al. β -Hydroxybutyrate deactivates neutrophil NLRP3 inflammasome to relieve gout flares [J]. Cell Rep, 2017, 18(9):2077-2087.
- [23] WANG D, WANG H, GAO H, et al. P2X7 receptor mediates NLRP3 inflammasome activation in depression and diabetes [J]. Cell Biosci, 2020, doi: 10.1186/s13578-020-00388-1.
- [24] SU W J, ZHANG Y, CHEN Y, et al. NLRP3 gene knockout blocks NF- κ B and MAPK signaling pathway in CUMS-induced depression mouse model[J]. Behav Brain Res, 2017, 322(Pt A):1-8.
- [25] LEFF-GELMAN P, MANCILLA-HERRERA I, FLORES-RAMOS M, et al. The immunesystem and the role of inflammation in perinatal depression [J]. Neurosci Bull, 2016, 32(4):398-420.
- [26] LI Z Q, YAN Z Y, LAN F J, et al. Suppression of NLRP3 inflammasome attenuates stress-induced depression-like behavior in NLGN3-deficient mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501 (4) : 933-940.
- [27] KAJITANI N, IWATA M, MIURA A, et al. Prefrontal cortex infusion of beta-hydroxybutyrate, an endogenous NLRP3 inflammasome inhibitor, produces antidepressant-like effects in a rodent model of depression [J]. Neuropsychopharmacol Rep, 2020, 40 (2):157-165.
- [28] 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.
- [29] COLL R C, ROBERTSON A A, CHAE J J, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases [J]. Nat Med, 2015, 21(3):248-255.
- [30] MANGANM S J, OLHAVA E J, ROUSH W R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17 (8) : 588-606.

[责任编辑 周冰冰]