

六味地黄汤促进自噬调控小胶质细胞表型减轻糖尿病抑郁大鼠ACC髓鞘损伤及抑郁行为

黄芳^{1,2}, 谭子虎^{1,3*}, 陈奕妙¹, 单楠¹, 鄢文静¹

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院, 武汉 430014;
3. 湖北省中医院, 武汉 430061)

[摘要] 目的:观察六味地黄汤对糖尿病抑郁(DD)大鼠抑郁样行为的影响,并探讨其作用机制。方法:50只SPF级雄性SD大鼠采用高脂饮食喂养加尾静脉注射小剂量链脲佐菌素(STZ)的方法制备糖尿病模型,随后糖尿病大鼠予28 d慢性不可预测的轻度应激(CUMS)的方法建立DD模型。随机分为5组,分别为模型组、氟西汀组(氟西汀10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、六味地黄汤低、中、高剂量组(3.375、6.75、13.5 g·kg⁻¹·d⁻¹),每组10只。另取正常组10只,生理盐水灌胃。连续灌胃4周后,强迫游泳实验用于评估大鼠的抑郁表型,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测前扣带回皮层(ACC)肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-10(IL-10)表达水平;免疫荧光检测ACC区髓鞘碱性蛋白(MBP)表达、小胶质细胞离子钙结合衔接分子1(Iba1)与微管相关蛋白1轻链3(LC3)共定位;蛋白免疫印迹法检测ACC区MBP、髓鞘脂蛋白(PLP)、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和Beclin-1、LC3、p62及小胶质细胞(MG)表型相关蛋白诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、精氨酸酶1(Arg1)蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠在强迫游泳实验中游泳时间下降、不动时间增加($P<0.01$)。与模型组比较,六味地黄汤中、高剂量组不动时间均有不同程度地降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠ACC区MBP、PLP、MOG蛋白表达降低($P<0.01$);与模型组比较,氟西汀组、六味地黄汤中、高剂量组MBP、PLP、MOG蛋白表达不同程度上调($P<0.05$, $P<0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠ACC区MBP荧光强度显著降低($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄汤中、高剂量组和氟西汀组MBP荧光表达强度不同程度地增加($P<0.05$, $P<0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠iNOS表达增加($P<0.01$),Arg1蛋白的表达轻度增加。与模型组相比,六味地黄汤中、高剂量组和氟西汀组iNOS表达下调,Arg1蛋白表达上调($P<0.05$, $P<0.01$),氟西汀组与六味地黄汤中、高剂量组之间差异无统计学意义。与正常组比较,模型组大鼠ACC促炎因子IL-1 β 、TNF- α 表达显著增加($P<0.01$),抗炎因子IL-4、IL-10水平轻度增加。与模型组比较,氟西汀组、六味地黄汤中、高剂量组IL-1 β 、TNF- α 表达下调($P<0.05$, $P<0.01$),IL-4、IL-10表达水平明显增加($P<0.05$, $P<0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠Beclin-1和LC3 II蛋白的表达降低($P<0.01$),p62蛋白的表达增加($P<0.01$)。与模型组比较,六味地黄汤中、高剂量组和氟西汀组Beclin-1和LC3 II表达上调($P<0.01$),p62表达下调($P<0.01$);与正常组比较,模型组ACC区LC3⁺Iba1⁺细胞数明显减少($P<0.01$);与模型组比较,氟西汀组和六味地黄汤中、高剂量组LC3⁺Iba1⁺细胞数不同程度地增加($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:六味地黄汤改善DD大鼠抑郁样行为,其机制可能是通过促进MG自噬,调控MG表型变化,增加MG对髓鞘碎片的清除;同时MG表型转换还抑制DD大鼠ACC炎症水平,改善少突胶质细胞增殖、分化的局部微环境,并最终促进受损髓鞘修复及再髓鞘化。

[关键词] 糖尿病; 抑郁; 髓鞘; 自噬; 小胶质细胞表型; 六味地黄汤

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R284;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)06-0007-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220305

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211224.1636.010.html>

[网络出版日期] 2021-12-27 10:35

Liuwei Dihuangtang Alleviates Myelin Injury in Anterior Cingulate Cortex and Depression-like Behaviors of Rats with Diabetes Mellitus and Depression via Promoting Autophagy and Regulating Microglial Phenotype

[收稿日期] 2021-10-09

[基金项目] 湖北省科技创新专项立项项目(2021CFB533);武汉市科技计划应用基础前沿项目(2020020601012244);武汉市中心医院学科基金项目(2021XK025)

[第一作者] 黄芳,在读博士,从事中医药防治脑病的基础研究,Tel:027-88929217,E-mail:79355949@qq.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

HUANG Fang^{1,2}, TAN Zi-hu^{1,3*}, CHEN Yi-miao¹, SHAN Nan¹, YAN Wen-jing¹

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, China; 3. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Liuwei Dihuangtang (LWDHT) on depression-like behaviors of rats with diabetes mellitus and depression (DD) and explore its mechanism. **Method:** The diabetes mellitus (DM) model was induced by the high-fat diet and tail vein injection of low-dose streptozotocin (STZ) in 50 male Sprague-Dawley rats of SPF grade. Then the DD model was induced by chronic unpredictable mild stress (CUMS) for 28 days in DM rats. Fifty DD rats were randomly divided into model group, fluoxetine group (10 mg·kg⁻¹·d⁻¹), and low-, medium-, and high-dose LWDHT groups (3.375, 6.75, 13.5 g·kg⁻¹·d⁻¹), with 10 rats in each group. Another 10 healthy rats were assigned into a control group and received normal saline by gavage. After four weeks of drug intervention, the forced swimming assay was carried out to assess the depression-like behaviors of rats. The expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-4 (IL-4), and interleukin-10 (IL-10) in the anterior cingulate cortex (ACC) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunofluorescence was used to detect the expression of myelin basic protein (MBP) in ACC and the co-localization of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) with intracellular microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3). The protein expression levels of MBP, myelin proteolipid protein (PLP), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), Beclin-1, LC3, p62, and microglia (MG) phenotypic protein-related inducible nitric oxide synthase (iNOS), and arginase 1 (Arg1) were detected by Western blot. **Result:** Compared with the control group, the model group showed shortened swimming time and prolonged immobility time ($P<0.01$). Compared with the model group, the medium- and high-dose LWDHT groups showed reduced immobility time ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the control group, the model group showed decreased protein expression of MBP, PLP, and MOG in the ACC region ($P<0.01$). Compared with the model group, the fluoxetine group and the medium- and high-dose LWDHT groups showed up-regulated protein expression of MBP, PLP, and MOG ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the control group, the model group showed decreased MBP fluorescence intensity in the ACC region ($P<0.01$). Compared with the model group, the fluoxetine group and the medium- and high-dose LWDHT groups showed increased MBP fluorescence intensity in the ACC region ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the control group, the model group showed increased expression of iNOS ($P<0.01$) and slightly increased Arg1 protein expression. Compared with the model group, the medium- and high-dose LWDHT groups and the fluoxetine group showed down-regulated iNOS expression and up-regulated Arg1 protein expression ($P<0.05$, $P<0.01$), but there was no significant difference between the fluoxetine group and the medium-, high-dose LWDHT groups. Compared with the control group, the model group showed increased expression levels of proinflammatory factors IL-1 β and TNF- α in the ACC region ($P<0.01$) and slightly increased expression levels of anti-inflammatory factors IL-4 and IL-10. Compared with the model group, the fluoxetine group, and the medium- and high-dose LWDHT groups showed down-regulated expression of IL-1 β and TNF- α ($P<0.05$, $P<0.01$) and up-regulated expression of IL-4 and IL-10 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the control group, the model group showed reduced expression levels of Beclin-1 and LC3 II ($P<0.01$) and increased expression level of p62 ($P<0.01$). Compared with the model group, the fluoxetine group and the medium- and high-dose LWDHT groups showed up-regulated Beclin-1 and LC3 II expression ($P<0.01$) and down-regulated p62 expression ($P<0.01$). Compared with the control group, the model group showed decreased LC3⁺Iba1⁺ cells in the ACC region ($P<0.01$). Compared with the model group, the fluoxetine group and the medium- and high-dose LWDHT groups showed increased LC3⁺Iba1⁺ cells ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** LWDHT can alleviate the depression-like behaviors

in DD rats presumedly by promoting MG autophagy, regulating MG phenotypic changes, and increasing MG clearance of myelin sheath fragments. Meanwhile, MG phenotypic transformation also inhibits ACC inflammation in DD rats, improves the local microenvironment of oligodendrocyte proliferation and differentiation, and ultimately promotes the repair and remyelination of damaged myelin sheath.

[Keywords] diabetes mellitus; depression; myelin sheath; autophagy; microglial phenotype; Liuwei Dihuangtang

糖尿病是胰岛素分泌缺陷或胰岛素抵抗导致的以高血糖为特征的代谢性疾病。最新流行病学调查数据显示,我国的糖尿病患病率已高达11.2%,其中2型糖尿病(T2DM)患者占90%以上^[1],是我国目前突出的重大公共卫生问题。抑郁症是糖尿病常见并发症,此前流行病学调查显示,30%的糖尿病患者合并抑郁症^[2],而最新数据进一步显示,16%~34.5%的糖尿病患者存在中度以上的抑郁表现^[3-4]。抑郁症和糖尿病不仅增加彼此患病风险^[5],共病状态还严重影响患者对血糖管理的依从性,并导致医疗费用增加、生活质量下降,增加死亡风险^[6]。此外,常规抗抑郁药物因存在对食欲和体质量的影响,使其在糖尿病患者中的应用受到限制^[7]。鉴于糖尿病合并抑郁症存在的治疗困境,研究探索和开发更安全的治疗药物,成为目前临床迫切的现实需求。

六味地黄汤出自宋代医家钱乙《小儿药证直诀》,是滋阴补肾之经典名方,由熟地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、牡丹皮6味药组成。长期以来被用于治疗糖尿病及其并发症^[8],多项研究表明六味地黄汤可通过增加胰岛素分泌、增强脂肪和肌肉组织对葡萄糖的吸收、抑制肝细胞产生葡萄糖、降低胰岛素抵抗或增强胰岛素敏感性^[9-10]。因此,六味地黄汤可能通过控制高血糖,起到改善继发抑郁的作用。然而,临床及临床前研究也证实,六味地黄汤还可以改善非糖尿病患者的抑郁行为表型^[11-12]。提示六味地黄汤同时存在独立于血糖控制之外的抗抑郁作用机制,这也是本研究探索的目的和侧重点。因此,本文拟采用链脲佐菌素(STZ)联合慢性不可预测的轻度应激(CUMS)模拟糖尿病伴抑郁症共病模型,明确六味地黄汤改善糖尿病合并抑郁症的生物效应,并对其可能机制进行深入探讨。

1 材料

1.1 动物 成年雄性SD大鼠60只,体质量200~220 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22~25℃,相对湿度60%~65%,各组

大鼠自由摄食饮水,12 h明暗交替。本实验获得湖北省中医院伦理委员会批准,批号HBZY2020-C47-01。高脂饲料购于北京博泰宏达公司。

1.2 药物 六味地黄汤由熟地黄24 g、山茱萸12 g、山药12 g、茯苓9 g、泽泻9 g、牡丹皮9 g组成,所有饮片均购于湖北省中医院,经武汉市中心医院冯其麟主管药师鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》性状与外观相关规定。所有饮片由湖北省中医院药剂科煎煮,先用饮片总质量5倍量的蒸馏水将药材浸泡2 h,大火煮沸后文火煎煮30 min,收集药液,再向药渣中加入适量蒸馏水煎煮第2次,收集药液,将2次药液混匀后通过物理浓缩至生药含量为1 g·mL⁻¹,根据每次灌胃量分装,4℃保存。氟西汀胶囊购于湖北省中医院(礼来苏州制药有限公司,批号J20170022),无菌生理盐水配制成1 g·L⁻¹水溶液。STZ使用时现配,溶于0.1 mol·L⁻¹柠檬酸钠缓冲液配制成质量浓度为10 g·L⁻¹的溶液,过滤除菌。

1.3 试剂 一抗p62,髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为18420-1-AP、12690-1-AP、66009-1-Ig);髓鞘碱性蛋白(MBP)、髓鞘脂蛋白(PLP)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)A/B、Beclin-1抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为78896s、28702s、4108s、3495s);小胶质细胞离子钙结合衔接分子1(Iba1)抗体(美国Invitrogen公司,批号MA5-27726);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-4、IL-10试剂盒(武汉华美生物公司,批号分别为E11987r、E08055r、E04635r、E04595r);4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)试剂盒、增强化学发光法(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);化学羊抗鼠、羊抗兔二抗(美国Jackson Immuno-Research Laboratories公司,批号分别为115-005-003、111-005-003);驴抗兔荧光二抗555(南方科技公司,批号6441-32);山羊抗小鼠荧光二抗488(美国CST公司,批号4409s);STZ(德国Sigma-Aldrich公司,批

号18883-66-4);戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂公司,批号20020915)。

1.4 仪器 XM-650T型超声破碎仪(上海小美超声);044BR8277型蛋白电泳及转印装置(美国Bio-Rad公司);Observer.Z1型倒置荧光显微镜(德国Zeiss公司);ST-360型酶标仪(上海科华生物工程股份有限公司);X-30R型高速冷冻离心机(美国Allegra公司)。

2 方法

2.1 模型制备 参照文献制备糖尿病抑郁(DD)大鼠模型^[13],50只SPF级成年雄性SD大鼠采用高脂饲料喂养加尾静脉注射小剂量STZ的方法制备糖尿病模型,在此基础上再用28 d CUMS的方法建立DD模型。具体方法:大鼠高脂饮食喂养2周,禁食过夜后小剂量STZ单次尾静脉注射(38 mg kg^{-1})诱导糖尿病,通过尾静脉取血测血糖浓度,筛选2次空腹血糖 $>16.7 \text{ mmol L}^{-1}$ 表示糖尿病模型构建成功。随后糖尿病大鼠分别予CUMS建立DD模型,包括禁食或禁水24 h、夹尾1 min、4℃冰水浴5 min、昼夜颠倒24 h、电击(10 mA电流,1次/min,每次持续10 s,共30次)、震动(1次/s,持续15 min)、噪音(85 dB)8 h、异味。在28 d的时间内,随机选择1种刺激施加于大鼠。每只大鼠28 d内,每种刺激共2~3次。另取10只大鼠为正常组,正常饮食,无CUMS。

2.2 动物分组及给药 将通过糖尿病筛选并完成CUMS的大鼠分为5组。DD为模型组,药物干预组:六味地黄汤低、中、高剂量组(中药低、中、高剂量组),氟西汀组,每组10只。根据成人临床推荐剂量(60 kg 成人每天 75 g),按体表面积折算,六味地黄汤组按公式:大鼠的剂量=人的剂量 $\times 0.018 \times 5/\text{kg}$,计算得出每只大鼠每日给药剂量为 $6.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,低剂量组为 $3.375 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,高剂量组为 $13.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,氟西汀组灌胃剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。正常组予以生理盐水灌胃,共计28 d。

2.3 强迫游泳实验 强迫游泳实验是对动物抑郁行为进行研究的经典行为学方法,测试工具为透明塑料圆筒高60 cm,直径14 cm(温度 22 ± 2)℃。实验开始时将大鼠放入水中,测试时间为6 min,视频记录整个过程,统计后4 min内大鼠挣扎(有力的四肢运动、前肢打破水面、试图爬上圆柱体)、游泳(所有四肢协调运动)和不动(动物四肢不动漂浮于水面,仅头部露出水面呼吸)的时间。在测试结束后,

将动物从水中移出擦干水后放回笼中。

2.4 动物处理及取材 大鼠行为学检测结束后,1%戊巴比妥钠按 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射。随机取其中4只大鼠通过心脏灌注生理盐水和4%多聚甲醛,剥离鼠脑后放入4%多聚甲醛继续固定脱水,冰冻切片置于防冻液中 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,用于免疫荧光染色;剩余6只大鼠麻醉后,断头迅速剥离颅骨,冰上取前扣带回皮层(ACC)组织,分装于提前标记分组的微型离心管后, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,用于蛋白免疫印迹法(Western blot)、生化试剂盒检测指标。

2.5 Western blot检测ACC组织中相关蛋白表达 取各组大鼠适量ACC组织,加入RIPA裂解液,眼科剪剪碎,冰上静置30 min后,超声下裂解2个循环,低温下以 $12\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径7 cm)后取上层清液,BCA试剂盒测蛋白浓度后配平待测。配胶、上样(每孔上样量蛋白 $20 \mu\text{g}$)、电泳、转膜,一抗均按1:1 000稀释, β -actin按1:1万稀释,4℃过夜,二抗按1:1万稀释,室温孵育2 h,磷酸盐缓冲液(PBS)洗膜,ECL发光液孵育1 min后,曝光拍照用Image J分析灰度值。

2.6 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测ACC组织中TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、IL-10含量 使用新鲜配平后的待测蛋白,根据TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、IL-10试剂盒步骤包被、加样、加酶标抗体、底物显色、终止反应后在酶标仪下读数,根据标准曲线计算结果。

2.7 免疫荧光 将各组待测脑片中ACC部位相近位置脑片从防冻液中捞出,分别置于采血板中,PBS洗3遍,0.5% triton破膜40 min,5% BSA室温下封闭1 h,加入一抗(MBP 1:1 000,LC3 1:200,Iba1 1:200),4℃孵育过夜,PBS洗3遍,荧光二抗(555为1:500,488为1:250)室温下孵育4 h,PBS洗3遍,DAPI染色15 min,50%甘油封片,荧光显微镜下观察。

2.8 统计学方法 采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用One-way ANOVA分析,组间比较采用Turkey事后检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对DD大鼠抑郁状态的影响 与正常组比较,模型组大鼠在强迫游泳实验中游泳时间下降、不动时间增加($P < 0.01$),两组间比较挣扎时间差异无统计学意义;经中药低、中、高剂量干预后,中药中、高剂量组大鼠的不动时间均有不同程度的降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),低剂量组不动时间及游泳时间、挣扎

时间均无统计学意义,中药中、高剂量组与氟西汀组比较,游泳时间、不动时间、挣扎时间差异均无统计学意义。见表1。

表1 六味地黄汤对DD大鼠抑郁状态的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Liuwei Dihuangtang (LWDHT) on depression behavior of DD Rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	游泳时间	不动时间	挣扎时间
正常组		117.40±23.48	87.31±18.53	33.77±18.39
模型组		46.90±19.03 ¹⁾	159.06±32.47 ¹⁾	32.39±21.48
氟西汀组	0.01	93.84±18.81 ³⁾	103.82±27.7 ³⁾	40.93±25.25
中药低剂量组	3.375	57.42±30.17	143.58±32.39	37.10±17.84
中药中剂量组	6.75	83.85±18.38 ³⁾	114.49±29.42 ²⁾	39.77±24.36
中药高剂量组	13.5	97.13±18.80 ³⁾	106.69±31.06 ³⁾	35.22±21.25

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-表5同)

3.2 六味地黄汤改善DD大鼠ACC髓鞘损伤

3.2.1 对DD大鼠ACC髓鞘相关蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组MBP,PLP,MOG蛋白表达降低($P<0.01$);与模型组比较,中药低剂量组MBP,

表2 六味地黄汤对DD大鼠ACC脑区髓鞘相关蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of LWDHT on relative expression of myelin sheath related proteins in ACC brain region of rats in DD rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

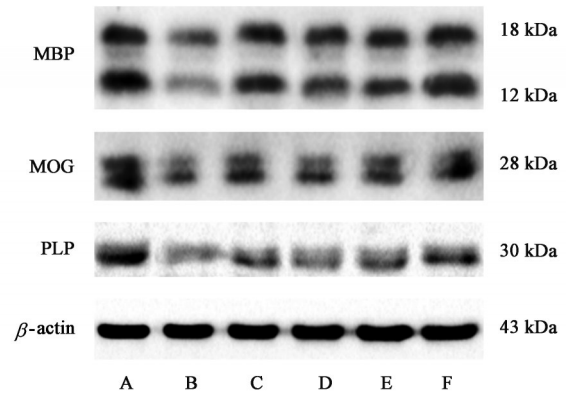
组别	剂量/g·kg ⁻¹	MBP/ β -actin	MOG/ β -actin	PLP/ β -actin
正常组		1.00±0.16	1.00±0.15	1.00±0.18
模型组		0.29±0.11 ¹⁾	0.31±0.14 ¹⁾	0.38±0.11 ¹⁾
氟西汀组	0.01	0.67±0.12 ³⁾	0.61±0.11 ³⁾	0.66±0.19 ²⁾
中药低剂量组	3.375	0.32±0.10	0.37±0.09	0.50±0.10
中药中剂量组	6.75	0.60±0.16 ³⁾	0.61±0.13 ³⁾	0.68±0.14 ²⁾
中药高剂量组	13.5	0.66±0.13 ³⁾	0.71±0.12 ³⁾	0.71±0.16 ³⁾

3.2.2 对DD大鼠ACC髓鞘蛋白MBP荧光强度的影响 与正常组(1.00±0.20)比较,模型组(0.26±0.12)ACC中MBP荧光强度显著减少($P<0.01$);与模型组比较,给予六味地黄汤干预后,低、中、高剂量组MBP荧光表达强度不同程度的增加,其中低剂量组(0.36±0.10)、中剂量组(0.53±0.13)、高剂量组(0.64±0.14)($P<0.05, P<0.01$),中药中、高剂量组之间比较差异无统计学意义;氟西汀组(0.62±0.14)MBP荧光表达强度显著增加($P<0.01$);氟西汀与中药中、高剂量组之间比较,对MBP荧光表达的差异无统计学意义。见图2。

3.3 六味地黄汤促进DD大鼠ACC小胶质细胞(MG)表型转换

3.3.1 对DD大鼠ACC MG表型相关蛋白表达的

MOG,PLP表达差异无统计学意义,氟西汀组、中药中、高剂量组MBP,PLP,MOG蛋白不同程度表达上调($P<0.05, P<0.01$),氟西汀与中药中、高剂量组之间比较,髓鞘蛋白表达的差异无明显统计学意义。见图1和表2。



注:A.正常组;B.模型组;C.氟西汀组;D.中药低剂量组;E.中药中剂量组;F.中药高剂量组(图2-图5同)

图1 各组大鼠ACC髓鞘相关蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of ACC myelin associated proteins expression of each group

影响 与正常组比较,模型组iNOS表达增加($P<0.01$),Arg1蛋白的表达轻度增加。与模型组比较,中药中、高剂量组iNOS表达下调、Arg1蛋白表达上调($P<0.01$),中药中、高剂量组之间差异无统计学意义;与模型组比较,氟西汀组iNOS表达下调、Arg1蛋白表达上调($P<0.01$),效果与中药高剂量组类似,差异无统计学意义。见图3,表3。

3.3.2 对DD大鼠ACC炎症因子表达的影响 与正常组比较,模型组促炎因子水平IL-1 β 、TNF- α 表达显著增加($P<0.01$),抗炎因子IL-4、IL-10水平轻度增加,差异无统计学意义。与模型组比较,中药低剂量组各炎性因子表达差异无统计学意义,氟西汀组、中药中、高剂量组IL-1 β 、TNF- α 表达明显下调、IL-4、IL-10表达水平明显增加($P<0.05$,

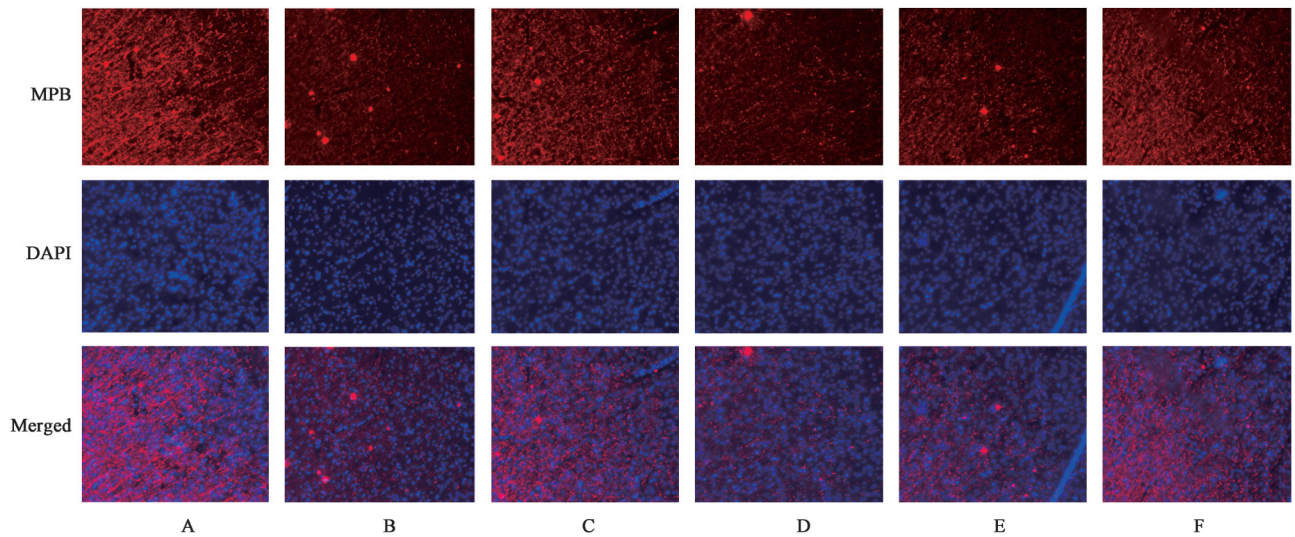


图2 六味地黄汤对DD大鼠ACC区域MBP荧光强度的影响(免疫荧光,×50)

Fig. 2 MBP immunofluorescence staining in ACC region of rats in each group(IF,×50)

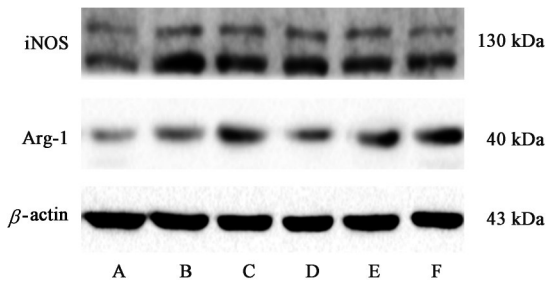


图3 各组大鼠ACC脑区MG表型蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of MG phenotypic protein expression in ACC brain area of rats in each group

$P<0.01$), 中药中、高剂量组之间差异无统计学意义; 氟西汀组与中药中、高剂量组比较, 差异无统计学意义。见表4。

3.4 六味地黄汤促进DD大鼠ACC自噬水平

3.4.1 对DD大鼠ACC自噬相关蛋白水平的影响 与正常组比较, 模型组 Beclin-1、LC3 II 显著降低, p62 水平增加($P<0.01$)。与模型组比较, 氟西汀组、

表3 六味地黄汤对DD大鼠ACC脑区MG表型相关蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of LWDHT on relative expression of MG phenotypic associated in ACC brain region of rats in DD rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	iNOS/β-actin	Arg1/β-actin
正常组		1.00±0.20	1.00±0.17
模型组		3.95±0.92 ¹⁾	1.12±0.30 ¹⁾
氟西汀组	0.01	2.39±0.55 ³⁾	3.14±0.84 ³⁾
中药低剂量组	3.375	3.10±0.93	1.44±0.54
中药中剂量组	6.75	2.46±0.53 ³⁾	2.77±0.75 ³⁾
中药高剂量组	13.5	2.07±0.61 ³⁾	3.31±0.63 ³⁾

中药中、高剂量组 Beclin-1、LC3 II 表达上调、p6 表达水平降低($P<0.05, P<0.01$), 中药中、高剂量组之间差异无统计学意义; 氟西汀组与六味地黄汤中、高剂量组比较, 差异无统计学意义。见图4和表5。

表4 六味地黄汤对DD大鼠ACC脑区炎症因子表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of LWDHT on inflammatory cytokines expression in ACC brain region of rats in DD rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1β	TNF-α	IL-4	IL-10
正常组		26.84±13.63	53.21±16.03	37.67±16.35	83.97±21.75
模型组		83.45±22.49 ¹⁾	204.45±42.29 ¹⁾	63.41±17.60	89.91±15.62
氟西汀组	0.01	44.60±18.49 ³⁾	80.87±23.17 ³⁾	125.36±20.57 ³⁾	140.66±27.23 ²⁾
中药低剂量组	3.375	62.71±15.29	153.81±28.04	67.85±24.94	98.94±18.19
中药中剂量组	6.75	51.96±13.46 ²⁾	108.42±40.56 ³⁾	107.95±17.78 ³⁾	133.61±25.70 ²⁾
中药高剂量组	13.5	43.57±17.80 ³⁾	78.89±22.87 ³⁾	129.12±23.85 ³⁾	150.44±34.84 ³⁾

3.4.2 六味地黄汤对ACC脑区LC3⁺Iba1⁺阳性细胞表达的影响 与正常组(4.08±1.31)比较, 模型组

(1.00±1.04)ACC中LC3⁺Iba1⁺细胞数显著减少($P<0.01$); 与模型组比较, 给予六味地黄汤干预后, 中药

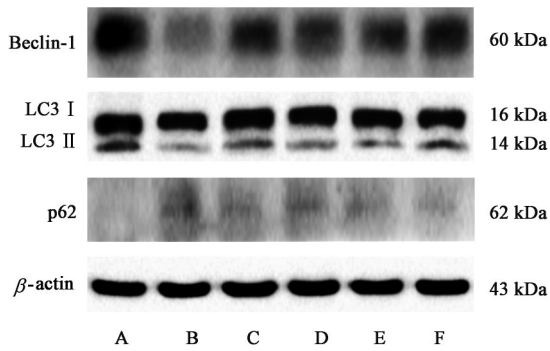


图4 各组大鼠ACC自噬相关蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of autophagy related proteins expression in ACC of each group

低、中、高剂量组[低剂量组(2.25±1.21),中剂量组(2.67±1.03),高剂量组(2.83±1.34)]LC3⁺Iba1⁺细胞数不同程度的增加($P<0.05$, $P<0.01$),氟西汀组(2.58±0.99)LC3⁺Iba1⁺细胞数增加($P<0.05$);与氟西汀组比较,中药高剂量组对LC3⁺Iba1⁺细胞数的影响差异无统计学意义。见图5。

4 讨论

临床和基础研究已充分证实糖尿病患者抑郁症状的高共病率^[14]。边缘系统等多个情绪调控脑区葡萄糖/胰岛素代谢异常与重度抑郁症状密切相关;除胰岛素分泌障碍,胰岛素抵抗也被显示与抑郁症发生呈正相关^[15]。葡萄糖是脑细胞的主要能量来源,过高的血糖水平降低积极情绪。而胰岛素作为体内唯一降低血糖的激素,不仅通过影响多巴胺水平调节情绪,其对血糖调控作用还直接参与调节神经细胞的生长、存活、增殖和分化^[16]。在本研究中,通过STZ联合高脂饮食建立T2DM模型大鼠,并在此基础上给予28 d CUMS。采用强迫游泳实验证实了T2DM模型大鼠合并应激时的抑郁表型。强迫游泳是评价动物抑郁表型的常用行为学方法,结果显示,与正常组比较,DD大鼠表现出明显的抑郁表型;在强迫游泳实验中的游泳时间缩短,而不动时间显著增加。而六味地黄汤干预,可

表5 六味地黄汤对DD大鼠ACC脑区自噬相关蛋白相对表达水平($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Beclin-1/ β -actin	LC3 II / I	p62/ β -actin
正常组		1.00±0.15	1.00±0.17	1.00±0.18
模型组		0.23±0.10 ¹⁾	0.27±0.12 ¹⁾	3.71±0.89 ¹⁾
氟西汀组	0.01	0.62±0.12 ³⁾	0.62±0.15 ³⁾	2.16±0.49 ³⁾
中药低剂量组	3.375	0.45±0.11	0.32±0.10	3.11±0.85
中药中剂量组	6.75	0.58±0.19 ³⁾	0.54±0.14 ²⁾	2.48±0.67 ²⁾
中药高剂量组	13.5	0.69±0.15 ³⁾	0.67±0.17 ³⁾	1.98±0.65 ³⁾

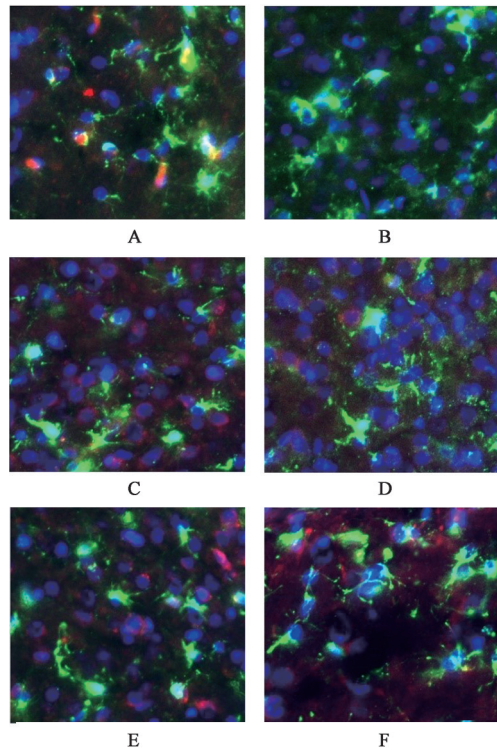


图5 六味地黄汤对ACC脑区LC3⁺Iba1⁺阳性细胞表达的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 5 Effect of LWDHT on LC3⁺Iba1⁺ positive cell expression in ACC region of rats in DD rats (IF, ×200)

以显著减少强迫游泳实验中的不动时间,增加游泳时间,改善DD大鼠抑郁行为。

针对六味地黄汤改善抑郁行为表型的作用机制,做了进一步研究。目前多数常规观点认为,神经元受损是抑郁症的病理生理基础^[17-18]。但近年来的最新研究,突出强调了髓鞘病变与抑郁症的密切联系^[19-21]。髓鞘增加轴突动作电位传输速度,协调信号传递的同步性。因此,髓鞘完整性是神经回路为基础的神经网络信息稳定传导的关键影响因素^[19]。已有研究证实,长期暴露于高血糖水平,可引起神经系统脱髓鞘^[22-23];研究还显示糖尿病转基因模型小鼠不仅存在神经组织髓鞘脂质的丢失,还

被观察到髓鞘受损先于神经功能破坏发生^[24],而促进髓鞘修复可以改善糖尿病模型小鼠焦虑抑郁行为^[25]。这些证据强烈提示,髓鞘损伤可能成为糖尿病合并抑郁新的干预靶点。通过 Western blot 和免疫荧光染色评估 ACC 区域的髓鞘在六味地黄汤干预前后的表达。扣带回是大脑边缘系统的组成部分,ACC 位于背内侧前额叶皮层内,涉及多种复杂的认知功能,例如冲动控制、情绪和决策,并与负面刺激过程中情绪调节相关^[26]。在抑郁症患者中 ACC 脑区不仅存在葡萄糖代谢改变,且与杏仁核的连接减少^[27];同时有研究显示,经历慢性压力后存在 ACC 体积显著减少^[28]。Western blot 结果显示 DD 大鼠 ACC 区域髓鞘相关蛋白表达水平显著降低,而六味地黄汤可以逆转髓鞘相关蛋白表达。DD 大鼠 ACC 区域 MBP 免疫荧光染色也观察到相同的变化趋势。这些结果共同证实,减轻 ACC 髓鞘损伤,可能是六味地黄汤改善 DD 大鼠抑郁行为表型的作用机制。

还进一步深入探讨了六味地黄汤减轻 DD 大鼠髓鞘损伤的具体作用机制。对脱髓鞘后髓鞘碎片的清除是决定少突胶质前体细胞募集、分化以及再髓鞘化的关键步骤^[29]。在这个过程中, MG 对髓鞘碎片的吞噬,对促进髓鞘再形成至关重要^[30]。MG 感受到病理或环境变化后迅速激活,按激活状态不同分为 M1 和 M2 型两种极化表型。当 MG 表现为 M1 促炎表型时,其吞噬能力和趋化性降低^[31],并分泌 IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子加重神经炎症和髓鞘损害^[32];而 M2 型 MG 则具有较强吞噬能力,可降解和清除髓鞘碎片,加速少突胶质细胞分化,促进再髓鞘化^[33]。因此,对各组大鼠 ACC 区域中, MG 表型相关标记蛋白及 MG 表型相关的炎症因子进行检测。结果显示, DD 大鼠 ACC 中 M1 型 MG 占优势,促炎因子分泌增加,存在炎症激活;给予六味地黄汤干预后, ACC 区域的 MG 向 M2 型转化,同时抗炎因子分泌明显增加。提示在六味地黄汤作用下,可以促进 DD 大鼠脑内 ACC 区域 MG 表型转换。MG 表型转换涉及多种调节机制,其中自噬被认为是影响 MG 吞噬作用和炎症状态的核心调节器^[34-35]。自噬的增强可以促进 MG 向 M2 型极化^[34],而抑制自噬导致 MG 向 M1 促炎表型极化^[35]。课题组前期研究发现,六味地黄汤激活腺嘌呤核苷酸依赖的蛋白激酶 (AMPK) 改善 DD 大鼠腹侧海马区氧化应激^[37]。AMPK 激活可以直接激活 ULK1,也可以抑制雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 磷酸化,从而促进自

噬^[38]。为验证六味地黄汤是否通过促进自噬调控 MG 表型变化,对 ACC 中自噬相关蛋白指标进行了检测,结果显示, DD 大鼠存在自噬受抑制,表现为 LC3 II / I 值及 Beclin-1 蛋白相对表达水平降低, p62 蛋白表达水平增加。而六味地黄汤干预增加 ACC 中 LC3 II / I 值和 Beclin-1 蛋白相对表达水平,降低 p62 表达。免疫荧光共标染色结果更清晰的表明,模型组自噬标记物 LC3 与 MG Iba1 共标明显减少,而六味地黄汤干预,显著增加 MG 中 LC3 表达。以上结果充分证明,六味地黄汤可能通过促进 MG 自噬,调控 MG 由 M1 向 M2 表型极化,增加 MG 吞噬髓鞘碎片能力,从而促进髓鞘损伤的修复。

糖尿病归属中医学“消渴”范畴。《济生方》明确指出:“消渴之疾,皆起于肾”,说明消渴病与肾直接相关。肾为先天之本,肾藏精生髓,脑为髓之海,脑根于肾,肾通于脑。脑主神明,为精明之府,阴精清阳奉养,性禀清灵,聚精以凝神。肾精不足以上荣头目,故脑失清灵,则神明不用,诸神失司,情志异常;糖尿病患者病程长,久病伤阴,肾阴不足,肾水无以上济于心,致使心肾不交,心肾失养,五脏受扰;久病致郁、肝失疏泄则发为郁证。六味地黄汤作为滋阴补肾之经典名方,熟地黄、山茱萸、山药三补,配伍泽泻、牡丹皮、茯苓三泻,肝脾肾同调,标本兼顾。方中地黄提取物梓醇通过 AMPK/NADPH 氧化酶 4 (NOX4)/磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 改善胰岛素抵抗^[39],促进髓鞘再形成^[40];山茱萸苷可显著提高脑缺血皮质中谷胱甘肽含量,增强超氧化物歧化酶活性,具有抗凋亡作用^[41];薯蓣皂苷通过调节神经免疫、促进自噬等途径产生抗焦虑抑郁效应^[42];茯苓多糖可调节单胺能神经传递和炎症^[43-44];牡丹皮中的丹皮酚、槲皮素、 β -谷甾醇和没食子酸具有抗氧化应激和神经炎症作用^[45]。因此,六味地黄汤不仅针对 DD 的病机特点,方中有效成分同时具有多种神经保护作用,可能为糖尿病伴抑郁患者的治疗提供新的选择。

综上所述,六味地黄汤通过促进 MG 自噬,调控 MG 表型变化,增加 MG 对髓鞘碎片的清除并抑制炎症水平,改善 DD 大鼠 ACC 少突胶质细胞增殖、分化的局部微环境,并最终促进受损髓鞘修复及再髓鞘化,减轻其抑郁行为表型。六味地黄汤改善血糖同时,可以通过减轻髓鞘损伤,改善抑郁行为,可能是糖尿病伴抑郁患者更好的治疗药物选择。同时本研究进一步证实了髓鞘损伤在 DD 发病机制中的重要影响,可能为糖尿病合并抑郁的治疗及机制

研究,提供更多干预靶点和治疗策略。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2020年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(4): 315-409.
- [2] HOLT R I G, SÖNKSEN P H. Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154(3):542-556.
- [3] KHALEDI M, HAGHIGHATDOOST F, FEIZI A, et al. The prevalence of comorbid depression in patients with type 2 diabetes: an updated systematic review and meta-analysis on huge number of observational studies [J]. *Acta Diabetol*, 2019, 56(6):631-650.
- [4] ASCHNER P, GAGLIARDINO J J, ILKOVA H, et al. High prevalence of depressive symptoms in patients with type 1 and type 2 diabetes in developing countries: results from the international diabetes management practices study[J]. *Diabetes Care*, 2021, 44(5):1100-1107.
- [5] NOUWEN A, ADRIAANSE M C, VAN DAM K, et al. Longitudinal associations between depression and diabetes complications: a systematic review and meta-analysis[J]. *Diabet Med*, 2019, 36(12):1562-1572.
- [6] PRADEEPA R, MOHAN V. Prevalence of type 2 diabetes and its complications in India and economic costs to the nation[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2017, 71(7): 816-824.
- [7] GILL H, GILL B, EL-HALABI S, et al. Antidepressant medications and weight change: a narrative review[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2020, 28(11):2064-2072.
- [8] LIU J P, FENG L, ZHANG M H, et al. Neuroprotective effect of Liuwei Dihuang decoction on cognition deficits of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetic rat [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(1):371-381.
- [9] CHENG X R, QI C H, WANG T X, et al. Characteristics of the traditional Liu-Wei-Di-Huang prescription reassessed in modern pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(2):103-121.
- [10] ZHENG W, WANG G, ZHANG Z, et al. Research progress on classical traditional Chinese medicine formula Liuwei Dihuang pills in the treatment of type 2 diabetes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, doi: 10.1016/j.biopha. 2019. 109564.
- [11] 薛岱榆,包文健,梁幼雅,等. 六味地黄汤干预抑郁大鼠学习记忆的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(9):8-14.
- [12] 王金华,吕素英. 六味地黄丸治疗神经官能症和更年期忧郁症疗效观察[J]. 淮海医药, 1999, 17(1):47.
- [13] LIU J, LIU L, HAN Y S, et al. The molecular mechanism underlying mitophagy-mediated hippocampal neuron apoptosis in diabetes-related depression[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(15): 7342-7353.
- [14] SU L, CAI Y, XU Y, et al. Cerebral metabolism in major depressive disorder: a voxel-based meta-analysis of positron emission tomography studies[J]. *BMC Psychiatry*, 2014, 14:321.
- [15] PERRY B I, KHANDAKER G M, MARWAHA S, et al. Insulin resistance and obesity, and their association with depression in relatively young people: findings from a large UK birth cohort[J]. *Psychol Med*, 2020, 50(4):556-565.
- [16] HAN C Y, LIU J, WAN F, et al. Effects of Tianqijiangtang capsule on survival, self-renewal and differentiation of hippocampal neural stem cells of embryonic rats cultured in high glucose medium [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(9):5560-5572.
- [17] 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.
- [18] 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, 2021, 46(5):1205-1210.
- [19] ZHOU B, ZHU Z, RANSOM B R, et al. Oligodendrocyte lineage cells and depression[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(1):103-117.
- [20] MA T, LI B, LE Y, et al. Demyelination contributes to depression comorbidity in a rat model of chronic epilepsy via dysregulation of Olig2/LINGO-1 and disturbance of calcium homeostasis [J]. *Exp Neurol*, 2019, doi:10.1016/j.expneurol. 2019. 113034.
- [21] LI B, XU Y, QUAN Y, et al. Inhibition of RhoA/ROCK pathway in the early stage of hypoxia ameliorates depression in mice protecting myelin sheath[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 11(17): 2705-2716.
- [22] LI R, WANG B, WU C, et al. Acidic fibroblast growth factor attenuates type 2 diabetes-induced demyelination via suppressing oxidative stress damage [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1):107.
- [23] CHEN Z, GUO H, LU Z, et al. Hyperglycemia aggravates spinal cord injury through endoplasmic reticulum stress mediated neuronal apoptosis, gliosis

- and activation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108672.
- [24] PALAVICINI J P, CHEN J, WANG C, et al. Early disruption of nerve mitochondrial and myelin lipid homeostasis in obesity-induced diabetes [J]. *JCI Insight*, 2020, doi:10.1172/jci.insight.137286.
- [25] YUAN P, ZHANG J, LI L, et al. Fluoxetine attenuated anxiety-like behaviors in streptozotocin-induced diabetic mice by mitigating the inflammation [J]. *Mediators Inflamm*, 2019, doi: 10.1155/2019/4315038.
- [26] YOSHINO Y, ROY B, DWIVEDI Y. Altered miRNA landscape of the anterior cingulate cortex is associated with potential loss of key neuronal functions in depressed brain [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2020, 40:70-84.
- [27] LAI C. Promising neuroimaging biomarkers in depression [J]. *Psychiatry Investig*, 2019, 16 (9) : 662-670.
- [28] MISQUITTA K A, MILES A, PREVOT T D, et al. Reduced anterior cingulate cortex volume induced by chronic stress correlates with increased behavioral emotionality and decreased synaptic puncta density [J]. *Neuropharmacology*, 2021, doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108562.
- [29] CIGNARELLA F, FILIPELLO F, BOLLMAN B, et al. TREM2 activation on microglia promotes myelin debris clearance and remyelination in a model of multiple sclerosis [J]. *Acta Neuropathol*, 2020, doi: 10.1007/s00401-020-02193-z.
- [30] CHU T, ZHANG Y P, TIAN Z, et al. Dynamic response of microglia/macrophage polarization following demyelination in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1):188.
- [31] LLOYD A F, MIRON V E. The pro-remyelination properties of microglia in the central nervous system [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(8):447-458.
- [32] KALAFATAKIS I, KARAGOGEOS D. Oligodendrocytes and microglia: key players in myelin development, damage and repair [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7):1-20.
- [33] BERGHOFF S A, SPIETH L, SUN T, et al. Microglia facilitate repair of demyelinated lesions via post-squalene sterol synthesis [J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24 (1):47-60.
- [34] LEE Y, GUPTA D P, PARK S H, et al. Anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in microglia via an autophagy dependent pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, doi:10.3389/fphar.2021.612981.
- [35] ALI T, RAHMAN S U, HAO Q, et al. Melatonin prevents neuroinflammation and relieves depression by attenuating autophagy impairment through FOXO3a regulation [J]. *J Pineal Res*, 2020, 69(2):e12667.
- [36] SHANG M, CHANG X, NIU S, et al. The key role of autophagy in silver nanoparticle-induced BV2 cells inflammation and polarization [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, doi:10.1016/j.fct.2021.112324.
- [37] 黄芳, 谭子虎, 单楠, 等. 六味地黄汤通过调节 AMPK/Akt/GSK3 β /Nrf2 通路减轻糖尿病抑郁大鼠 vHIP 髓鞘损伤及抑郁样行为 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20212402.
- [38] KIM J, MONDIRA K, BENOIT V, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of ULK1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 132-141.
- [39] YAN J, WANG C, JIN Y, et al. Catalpol ameliorates hepatic insulin resistance in type 2 diabetes through acting on AMPK/NOX4/PI3K/Akt pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 130:466-480.
- [40] CAI Q, MA T, TIAN Y, et al. Catalpol inhibits ischemia-induced premyelinating oligodendrocyte damage through regulation of intercellular calcium homeostasis via Na⁺/Ca exchanger 3 [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, doi:10.3390/ijms19071925.
- [41] WANG W, XU J, LI L, et al. Neuroprotective effect of morroniside on focal cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2010, 83(5):196-201.
- [42] CAI B, ZHANG Y, WANG Z, et al. Therapeutic potential of diosgenin and its major derivatives against neurological diseases: recent advances [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, doi:10.1155/2020/3153082.
- [43] ZHAO J, NIU X, YU J, et al. Poria cocos polysaccharides attenuated ox-LDL-induced inflammation and oxidative stress via ERK activated Nrf2/HO-1 signaling pathway and inhibited foam cell formation in VSMCs [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, doi:10.1016/j.intimp.2019.106173.
- [44] 陈可琢, 陈实, 任洁贻, 等. 茯苓酸性多糖抗抑郁作用及其调节神经递质和 NLRP3 通路机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(19):5088-5095.
- [45] SHI X, CHEN Y, LIU H, et al. Therapeutic effects of paeonol on methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine/probenecid-induced Parkinson's disease in mice [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14: 2397-2404.

[责任编辑 周冰冰]