

百合地黄汤治疗阴虚内热型抑郁症的机制

潘瑾¹, 潘文超¹, 迟显苏³, 薛晓燕¹, 高志礼¹, 王墉¹, 马铭涵¹, 逯艳婷¹,
马婷^{1,2*}, 马柯^{1,2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学经典名方协同创新中心, 济南 250355;
3. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

[摘要] **目的:**建立阴虚内热型抑郁症的中医证候动物模型并论述模型评价的合理性,多维分析mRNA差异表达基因以期探究百合地黄汤治疗阴虚内热型抑郁症的分子机制-信号通路及关键作用靶点。**方法:**雄性SD大鼠40只随机分为正常组、模型组、氟西汀组、百合地黄汤组、知柏地黄丸组。以慢性不可预知性温和刺激(CUMS)联合温热类中药造模方法构建阴虚内热型抑郁症模型,给予百合地黄汤治疗,氟西汀为阳性药,知柏地黄汤作为阴虚内热阳性药。通过检测各组大鼠的宏观基础状况、行为学表现和生化因子指标,综合评价模型构建。利用mRNA测序结果进行差异表达基因的筛选,并进行基因本体(GO)分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,绘制蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图,分析关键基因,探究百合地黄汤治疗阴虚内热型抑郁症的作用机制。**结果:**从基础状况、行为学测试、能量代谢、内分泌激素、细胞因子、神经递质6个方面对比表明模型构建成功。百合地黄汤可以通过调节神经系统、内分泌系统、炎症免疫系统相关通路明显改善阴虚内热型抑郁症,PPI网络关键基因为Fos, EphA8, Npy2r, Htr2c, Nr4a1。**结论:**该实验在中医辨证论治及病因病机学说指导下,建立符合百合病情志症状表征的阴虚内热型抑郁症动物证候模型及评价体系。通过分析mRNA测序结果进一步证实了模型构建的科学性及百合地黄汤干预阴虚内热型抑郁症的作用机制。

[关键词] 百合病; 抑郁症; 阴虚内热模型; 百合地黄汤; 机制研究

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)12-0031-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220117

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211129.1916.008.html>

[网络出版日期] 2021-11-30 17:43

Mechanism of Baihe Dihuangtang in Treatment of Depression with Yin Deficiency and Internal Heat

PAN Jin¹, PAN Wen-chao¹, CHI Xian-su³, XUE Xiao-yan¹, GAO Zhi-li¹, WANG Yong¹, MA Ming-han¹,
LU Yan-ting¹, MA Ting^{1,2*}, MA Ke^{1,2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250355, China;

2. Shandong TCM Classic Prescription Collaborative Innovation Center,
Shandong University of TCM, Jinan 250355, China;

3. Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a traditional Chinese medicine (TCM) syndrome model with yin deficiency and internal heat, discuss the rationality of model evaluation, and analyze differentially expressed genes in multiple dimensions to explore the molecular mechanism-signaling pathways as well as key targets of Baihe Dihuangtang (BHDH) in treating depression with Yin deficiency and internal heat. **Method:** Forty male

[收稿日期] 2021-07-27

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81903948)

[第一作者] 潘瑾,在读硕士,从事中医治疗情志病研究,E-mail:2312418590@qq.com

[通信作者] *马婷,博士,教授,中医方剂理论与应用研究,Tel:0531-89628060,E-mail:mastermt77@sina.com;

*马柯,博士,副教授,中医方证信号传导及微观机制研究,Tel:0531-89628077,E-mail:make19880710@163.com

SD rats were randomly divided into a blank control group, a model group, a fluoxetine group (positive drug), a BHDH group, and a Zhibai Dihuangtang group (positive drug for Yin deficiency and internal heat). The depression model with Yin deficiency and internal heat was induced by chronic unpredictable mild stress (CUMS) combined with Chinese herbal drugs with warm and heat nature. The model established was comprehensively evaluated by the detection of the basic condition, behavioral performance, and biochemical indicators of rats in each group. The differentially expressed genes were screened out by mRNA sequencing and underwent Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses. The protein-protein interaction (PPI) network was plotted and key genes were analyzed to explore the underlying mechanism of BHDH in treating depression with Yin deficiency and internal heat. **Result:** The comparison of basic conditions, behavioral assays, energy metabolism, endocrine hormones, cytokines, and neurotransmitters showed that the model was properly induced. BHDH could significantly improve depression with Yin deficiency and internal heat by regulating the pathways related to the nervous system, endocrine system, and inflammatory and immune system. The key genes of the PPI network were Fos, Epha8, Npy2r, Htr2c, and Nr4a1. **Conclusion:** Under the guidance of TCM theories of treatment based on syndrome differentiation and etiology and pathogenesis, this study established a depression model with Yin deficiency and internal heat in animals and evaluation system in accordance with the symptoms and signs of emotional diseases, and further confirmed the scientificity of the modeling method and the underlying mechanism of BHDH in interfering with depression with Yin deficiency and internal heat based on the results of mRNA sequencing.

[Keywords] emotional diseases; depression; model with Yin deficiency and internal heat; Baihe Dihuangtang; mechanism research

抑郁症是一种慢性情感性精神障碍型疾病,主要症状表现为显著而持久的心境低落、兴趣缺失、思维迟缓、意志活动减退、认知障碍甚至自杀倾向等,给社会造成了巨大的经济负担^[1-2]。目前抑郁症的发病机制尚未阐明,代表性假说包括单胺类神经递质功能失衡、炎症与氧化应激反应、下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴紊乱、神经营养因子浓度降低、突触可塑性降低等,基于上述假说研发的抗抑郁西药存在不同程度的副作用,包括起效缓慢、复发率高、效率低、认知障碍、增加自杀率等,中医中药凭借多靶点、多途径、整体调节且不良反应小的特点,在抑郁症的治疗方面表现出显著优势^[1-3]。

抑郁症属于现代医学名词,中医将其归属为“情志病”范畴,常散在出现于郁证、百合病、脏躁等疾病的古籍记载中^[3]。阴虚内热型抑郁症由于气郁日久,化火伤阴,阴阳失衡,虚热内生导致,治疗多从滋阴清热安神入手,与心肝肾三脏密切相关。主要临床表现为紧张焦虑、忧郁、猜疑、五心烦热、盗汗颧红、心悸失眠、舌红少苔、脉细数^[4]。《金匱要略》中记载的百合病症状包括心神不宁、精神恍惚、沉默寡言、坐立不安等,与阴虚内热型抑郁症极为相似,同时具有口苦尿赤脉微数等阴虚内热特征。《金匱要略·百合狐惑阴阳毒病脉证治》^[5]言:“百合病

者,百脉一宗,悉致其病也。”心主血脉肺朝百脉,心肺有热则百脉俱病,发为百合病,治疗当从养心安神、滋阴润肺入手^[6]。从临床表现、病因病机、治疗原则等方面综合推断,阴虚内热型抑郁症属于百合病的一种表现形式^[7]。百合地黄汤是治疗百合病的专方,临床可用于治疗中风后抑郁、产后抑郁、妇女围绝经期抑郁、青少年抑郁等多种抑郁症类型,能够增加神经递质的分泌,逆转神经元损伤,改善神经系统功能,有效延缓或阻断阴虚内热型抑郁症的发病进程^[8]。中医证候模型是阻碍中医药现代化发展的难题之一,阴虚内热型抑郁症的造模及模型评价方法尚未统一,作者初步探索阴虚内热型抑郁症的建立,尝试阐述百合地黄汤干预阴虚内热型抑郁症的分子标记物及机制。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠40只,雄性,5周龄,体质量(200±20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0011。本动物实验由山东中医药大学动物伦理委员会批准(伦理审查编号SDUTCM20210301018)。

1.2 药材 鲜百合(湖北神农架地区),鲜地黄(河南焦作),熟附子、肉桂、干姜由济南市中鲁医院提供(批号分别为180401、180701225、180505),以上

饮片经山东中医药大学药学院马山教授鉴定均符合2020年版《中华人民共和国药典》标准。

1.3 试剂 盐酸氟西汀分散片(法国 Patheon France公司,国药准字J20160029),蔗糖(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号20190523)。大鼠 γ 氨基丁酸(GABA,批号181229KE15),五羟色胺(5-HT,批号181229KE12),谷氨酸(Glu,批号181229KE25),白细胞介素-1 β (IL-1 β ,批号181229KE24),白细胞介素-6(IL-6,批号181229KE10),白细胞介素-10(IL-10,批号181229KE11),甲状腺素(T₄,批号181229KE17),促甲状腺激素释放激素(TRH,批号181229KE19),皮质醇(CORT,批号181229KE20),葡萄糖转运蛋白5(GLUT5,批号181229KE26),甘油三酯(TG,批号181229KS28,181229KS25),三磷酸腺苷(ATP,批号181229KE21),以上12个酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒均购自江苏晶美生物科技有限公司。

1.4 仪器 XY-2C型电子天平(江苏省常州市万德天平仪器厂),DT-880B型手持式红外测温仪(深圳市华盛昌机械实业有限公司),DGH-9076A型电热鼓干燥箱(上海习仁科学仪器有限公司),XRY-1A型数显氧弹热量计(上海密通机电科技有限公司),寒热迷宫实验系统(山东中医药大学,专利号2019SR0067746),5427R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司),Synergy H1型酶标仪(美国Bio Tek公司)。

2 方法

2.1 水煎液的制备

2.1.1 热性中药 《医宗金鉴·删补名医方论》言:“大热则伤阴。”大剂量服用辛热之品会耗伤津液,阴津亏虚导致阴虚,阴虚无以制约阳气,阴阳失衡,出现阴虚内热证。熟附子、肉桂、干姜三味药为全国高等中医药院校规划教材第10版《中药学》课本中排名前三位的温里药,性味辛热,易伤津液,故阴虚津亏者禁用。

熟附子、肉桂、干姜,按照1:1:1的比例混合^[9-10],浸泡1h,煎煮2次(第1次8倍水,第2次6倍水),合并过滤,65℃水浴浓缩至含生药量4.1 g·mL⁻¹的水煎剂,4℃冷藏。

2.1.2 百合地黄汤^[3] 鲜百合500g煎取200mL,鲜地黄400g榨汁取200mL。合并2次煎液浓缩至含生药量为3 g·mL⁻¹的水煎剂,4℃冷藏。

2.2 阴虚内热型抑郁症模型制备 在广泛应用的慢性不可预知性温和刺激(CUMS)抑郁模型造模基

础上灌胃热性中药来复制阴虚内热型抑郁症模型^[9-13]。适应性饲养1周后,热性中药灌胃剂量为62 g·kg⁻¹,每次3 mL。每日随机选取2种慢性不可预知温和刺激,每种刺激前后2 d不重复出现,持续4周,具体刺激包括禁水、禁食、空瓶刺激、潮湿垫料、空间束缚、倾斜笼、冷刺激、鼠笼旋转、空间拥挤、社交孤立^[10]。

2.3 分组及给药 适应性饲养1周后,随机分为正常组、模型组、氟西汀组、百合地黄汤组、知柏地黄丸组,每组10只。正常组自由饮水进食,2~5周其余各组按上述造模方法构建阴虚内热抑郁症动物模型。3~6周按照分组给药,按照人与大鼠药物剂量折算公式,氟西汀组2 mg·kg⁻¹,百合地黄汤组90 g·kg⁻¹,知柏地黄丸组0.408 g·kg⁻¹,正常组、模型组给予同等体积的生理盐水,分早晚两次给药。

2.4 基础状况和行为学测试

2.4.1 阴虚内热指标检测 药物干预治疗之后,测试大鼠的体表温度、体质量、肛温、寒热趋向、可代谢能,检测模型组大鼠阴虚内热指标变化及百合地黄汤(仲景原方)对模型的干预作用^[9,11-13]。

2.4.1.1 体表温度 红外照相机拍摄大鼠背部,电脑端显示红外热图及体表温度数值。

2.4.1.2 肛温 肛温计探入大鼠肛内2 cm,读取温度计数值。

2.4.1.3 寒热趋向 使用自制寒热趋向行为测定仪,将寒、热箱温度分别控制在室温(24±3)℃。将大鼠置于常温箱3次,检测10 min内进入寒、热箱的次数和时间,计算寒热趋向比例。

2.4.1.4 代谢笼测试 观察记录24 h内每只大鼠的进食量、饮水量、粪便和尿液(量、色、质)。粪便烘干至恒重,精确计算前后差值。使用XRY-1A型数显氧弹热量计检测饲料及粪便的热值,计算摄入能、粪便能、消化能、可代谢能等指标。

2.4.2 抑郁指标检测 药物干预治疗结束后,测试各组大鼠糖水偏好、强迫游泳两种抑郁样行为学实验,检测模型组抑郁指标及百合地黄汤(仲景原方)的抗抑郁作用。

2.4.2.1 糖水偏好实验(SPF) 给予大鼠1%蔗糖水与清水提前适应24、12 h后调换位置。测试之前禁水不禁食4 h,测试时间为8、4 h后调换瓶子位置。统计糖水、清水摄入量,计算糖水偏好度。

2.4.2.2 强迫游泳实验^[14] 将大鼠放入强迫游泳玻璃缸中,水深距离仪器顶端约14 cm,水温24℃左右。摄像机记录大鼠6 min内的挣扎、漂浮、不动时

间。前2 min为适应阶段,数据统计选取后4 min的不动时间。

2.4.3 生化指标检测 最后一次行为学测试后,禁食不禁水12 h,采集大鼠血清。麻醉后腹主动脉取血,5 000 r·min⁻¹,离心15 min(离心半径10 cm),取上清-80 °C保存。用ELISA方法检测12种生化因子,具体实验步骤按照江苏晶美生物科技有限公司试剂操作。

2.4.4 mRNA差异表达基因分析 本测序服务由欧意生物科技有限公司提供,送检样本为SD大鼠前额叶皮层。根据mRNA的测序结果筛选所有的差异表达基因,筛选标准为差异倍数(FC)≥2, P_{value}<0.05,表达量FPKM>0.01,组间表达量 basemean>0.01,最终得到符合标准的mRNA 73个。对这73个差异表达的mRNA进行基因本体(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析,并进一步分析核心蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图。将模型组和正常组,百合地黄汤组和模型组的基因表达量进行筛选,FPKM=0的mRNA全部删除,取 P_{value}和 log₂FC值做两组之间差异表达基因的火山图。

2.5 统计学处理 运用GraphPad Prism 8.4.0统计作图软件进行统计学评价,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对于符合正态趋势分布和方差齐的两组间计量资料比较采用t检验,多组计量资料采用方差分析,多组计量资料两两比较采用最小显著性差异法(LSD),P<0.05认为差异具有统计学意义。

3 结果

造模前各组大鼠一般状态无明显变化,体型匀称,增长稳定,毛色顺滑,性格温顺,各指标较为平稳。模型组大鼠体型消瘦,体质量增长缓慢、减轻,小便减少发黄,大便秘结,眼部分泌物增多,情绪易

激惹,自主活动增加,喜凉爽,毛色枯槁变黄、脱落量增加。基于中医病因学说的阴虚内热证候模型更加符合中医临床疾病的症状表现。

3.1 阴虚内热抑郁症模型评价 临床实验和动物实验均表明阴虚内热证会导致能量代谢和脂质代谢增加,体质量减轻,体温耐热性升高,情绪焦虑,偏好寒冷等表型^[9,11-13],4周造模结束后,测试正常组和模型组的体表温度、体质量、肛温、寒热趋向和可代谢能,作为评价阴虚内热模型构建的特异性指标^[9,15]。结果模型组大鼠体表温度较正常组显著升高(P<0.01)。模型组大鼠体质量较正常组显著降低(P<0.01),肛温较正常组显著升高(P<0.01),寒热趋向行为检测中进入寒箱时间比例较正常组显著升高(P<0.01),可代谢能较正常组显著升高(P<0.01)。对正常组和模型组进行糖水偏好度、强迫游泳实验测试,作为抑郁症模型的评价指标。模型组大鼠糖水偏好度较正常组显著降低(P<0.01),强迫游泳实验中的不动时间较正常组显著增长(P<0.01)。基础体质状况和行为学两方面结果表明连续4周CUMS诱导和热性中药复方给药初步构建了阴虚内热抑郁症模型。

3.2 阴虚内热抑郁症模型生物学表达特征 4周造模结束后,采集各组大鼠血清,利用酶联免疫吸附测定方法检测12种生化因子,其中包括3种神经递质,3种细胞因子,3种内分泌激素,3种能量代谢物^[9,11-13]。分析正常组和模型组大鼠血清中TRH、T₄和CORT,能量代谢物TG、GLUT5、ATP含量,评价阴虚内热模型构建。模型组大鼠血清中TRH、T₄和CORT、TG、GLUT5、ATP含量与正常组比较均显著升高(P<0.01)。百合地黄汤对模型大鼠血清中内分泌激素、能量代谢物水平见表1。

表1 百合地黄汤及氟西汀对模型大鼠血清中内分泌激素、能量代谢物水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Baihe Dihuangtang and fluoxetine on endocrine hormone and energy metabolite levels in the serum of model rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	TG/mmol·L ⁻¹	GLUT5/mmol·L ⁻¹	ATP/mmol·L ⁻¹	TRH/pmol·L ⁻¹	T ₄ /pmol·L ⁻¹	CORT/μg·L ⁻¹
正常组	1.42±0.22	20.60±3.91	451.71±44.33	3.31±0.53	1 103.62±135.68	44.63±7.84
模型组	1.65±0.23 ¹⁾	30.19±2.96 ¹⁾	639.40±98.18 ¹⁾	5.61±0.85 ¹⁾	1 307.08±149.36 ¹⁾	71.61±6.63 ¹⁾
氟西汀组	1.66±0.10 ²⁾	26.11±4.70 ²⁾	562.69±116.71 ²⁾	4.39±1.29 ²⁾	1 237.30±209.40 ²⁾	61.07±10.21 ²⁾
百合地黄汤组	1.45±0.13 ²⁾	23.65±5.81 ²⁾	512.85±104.89 ²⁾	4.25±1.31 ²⁾	1 127.69±144.16 ²⁾	53.98±12.59 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01(表2同)

分析正常组和模型组血清中5-HT、GABA、Glu、IL-1β、IL-6、IL-10含量,评价抑郁症模型构建结果。模型组大鼠血清中5-HT、GABA、Glu含量与

正常组比较显著降低(P<0.01),IL-1β、IL-6、IL-10含量与正常组比较显著升高(P<0.01)。见表2。

由此表明,连续4周CUMS诱导和热性中药复

表2 百合地黄汤及氟西汀对模型大鼠血清中神经递质、细胞因子水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Baihe Dihuangtang and fluoxetine on neurotransmitter and cytokine levels in serum of model rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	IL-1 β /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	IL-10/ng·L ⁻¹	5-HT/ μ g·L ⁻¹	Glu/ μ g·L ⁻¹	GABA/ μ g·L ⁻¹
正常组	29.25 \pm 3.96	43.33 \pm 8.04	97.19 \pm 12.58	367.01 \pm 50.95	7.24 \pm 0.78	1 798.32 \pm 302.46
模型组	44.31 \pm 3.04 ¹⁾	91.27 \pm 8.45 ¹⁾	72.83 \pm 11.74 ¹⁾	267.56 \pm 26.97 ¹⁾	11.58 \pm 1.77 ¹⁾	1 389.42 \pm 268.16 ¹⁾
氟西汀组	33.35 \pm 9.66 ²⁾	58.14 \pm 14.57 ²⁾	78.17 \pm 9.37 ²⁾	333.02 \pm 39.50 ²⁾	7.98 \pm 0.73 ²⁾	1 712.42 \pm 341.49 ²⁾
百合地黄汤组	30.87 \pm 7.06 ²⁾	61.76 \pm 15.21 ²⁾	84.78 \pm 15.44 ²⁾	303.55 \pm 53.39 ²⁾	10.38 \pm 1.80 ²⁾	1 691.20 \pm 256.44 ²⁾

方给药造模后,从大鼠血清中能量代谢物、内分泌激素、细胞因子和神经递质水平4种微观生物学表达角度初步构建了阴虚内热抑郁症模型。见增强出版附加材料。

3.3 mRNA差异表达基因分析 差异表达基因包括 K1, Ndst4, Slc9a4, Prr32, Qk, Cabp7, Kcne2, Calml4, Lrrc10b, Cldn9, Spag6, Shisa6等。

3.3.1 KEGG通路富集分析 根据每条通路富集的基因个数选择前20条作KEGG通路富集分析。差异基因富集通路包括神经活性配体-受体相互作用,钙信号通路,雌激素信号通路,有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK),环磷酸腺苷信号通路,昼夜节律,IL-17信号通路,醛固酮合成与分泌,甲状旁腺激素(PTH)的合成分泌和作用,谷氨酸能突触,瞬时受体电位(TRP)通道的炎症介质调节、神经营养因子。见增强出版附加材料。

3.3.2 GO分析 根据GO分析结果,分别选取的生物过程(BP),细胞组分(CC),分子功能(MF)的前10条生物学过程做差异表达基因的GO三联图。skeletal muscle cell differentiation, regulation of appetite, cell fate determination, cytoplasm, translation release factor complex, dynein complex, DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II -specific, virus receptor activity, L-glutamate transmembrane transporter activity为关键生物学功能。见增强出版附加材料。

3.3.3 核心PPI网络 把筛选好的73个差异表达基因导入华大基因多组学系统做PPI图。经过分析,连接节点越多的mRNA节点越大颜色越深,证明在互作网络中的关联作用越强。其中关键节点基因为 Fos、Epha8、Npy2r、Htr2c、Nr4a1、Atf3、Rem2、Maff、Fosb。见增强出版附加材料。

3.3.4 差异基因火山图 模型组与正常组、百合地黄汤组与模型组间的差异表达基因的火山图,见增强出版附件材料。红色三角表示表达量上升基因,绿色三角表示表达量下降基因,灰色三角号表示无

显著差异变化的基因。火山图能够直观的查看两样本之间的表达水平差异程度及其统计学显著性。见增强出版附加材料。

4 讨论

阴虚内热证主要病机为“阴液亏虚,虚热内生”。《医宗金鉴·删补名医方论》言:“大热则伤阴”。过量服用辛温燥热之品容易导致阴液暗耗,阴虚无以制阳,阴阳失衡则出现阳偏胜阴偏衰的虚热证。基于“大热伤阴”的耗伤阴液法是广泛认可的阴虚内热模型制备方法^[16-17],更贴近于临床疾病的发展规律。目前常见的注射糖皮质激素(氢化可的松、地塞米松)干扰机体正常的免疫系统及内分泌系统,导致体温升高来模拟发热模型的造模方法^[18-19],维持时间短并且对实验动物本身造成了器质性损伤,扰乱了机体的内环境稳态,这与中医疾病的发展规律背道而驰。

中医证候动物模型是阻碍中医药现代化研究的难点之一,模型评价更是处于初步探索阶段,尚未形成一套完整的模型评价体系。《黄帝内经》曰:“盖有诸内者,必形诸外。”症状和体征是疾病的外在表现,是中医辨证论治的基础,也是模型评价的第一步。其次证候模型的分子标记物及微观机制是中医证候模型研究的重中之重。中医学认为疾病证候是动态的变化过程,致使中医证候不像西医疾病有判定的黄金标准或者生物学标记物,阻碍了中医药现代化研究的发展,作者初步探究阴虚内热型抑郁症的模型构建及评价,观察分析百合地黄汤干预治疗后的大鼠基础体征、阴虚内热证、抑郁症指标变化,从宏观和微观两个角度来论证阴虚内热模型的构建,希望能用现代生物学技术来找到反应中医证候模型动态变化的标记物及其微观机制。

抑郁症发病机制复杂,代表性的假说包括单胺类神经递质假说,炎症与氧化应激反应,HPA功能失调,突触可塑性降低,神经营养因子分泌障碍,昼夜节律紊乱等^[20-21]。5-HT属于单胺类神经递质的一种,在抑郁症的众多发病机制中扮演重要角色,

基于经典的“单胺假说”研发的抗抑郁药物5-HT再摄取抑制剂已广泛应用于临床^[22]。Glu与GABA参与大脑神经中枢系统兴奋性抑制性的调节,有研究表明兴奋性Glu能神经元和抑制性GABA能神经元数量减少可能导致神经环路功能异常,Glu/GABA信号通路的稳态失去平衡可以导致抑郁症在内的诸多神经精神疾病^[23]。近年来众多抗抑郁新药研究者尝试突破现有单胺假说的框架,基于大脑兴奋性调节的非单胺策略逐渐兴起,其中GABA与Glu的动态平衡成为关注的焦点^[24]。IL-1 β ,IL-6,IL-10介导的炎症反应会影响与情志调节相关的神经递质及神经环路的形成。大量临床研究显示,抑郁症患者脑内炎症水平的升高促进了应激系统的亢进,内分泌激素释放量随之增加,加剧了患者的抑郁情绪。抑郁状态下患者的免疫系统功能降低,IL-1 β ,IL-6,IL-10作为重要的免疫调节相关因子,可作为衡量抑郁症患者抑郁程度的指标之一^[21,25]。虚热证模型与机体能量代谢功能之间有着密切联系,甲状腺激素是影响能量代谢最主要的激素,能够促进机体新陈代谢并调控基础体温,T₄,TRH升高可作为中医虚热证的有效指标^[26]。实验研究表明虚热模型小鼠体内糖皮质激素浓度升高,糖脂代谢水平旺盛,GLUT5活性和数量增加,同时糖代谢增加为胆固醇的生物合成提供能量,血清TG浓度升高^[27]。ATP的分解与合成是体内储存和转移能量的关键环节,是反映机体能量代谢的可靠指标^[28]。HPA轴是调节神经-内分泌网络的重要枢纽,是应激反应的信号器,在慢性应激条件下失衡,导致CORT浓度升高,其调节中枢神经系统、促进机体代谢、调节体温等功能出现紊乱^[29]。药物干预治疗前后各组大鼠的虚热指标及抑郁指标的变化水平,证明阴虚内热抑郁症模型已初具模型。

抑郁症属神经精神系统疾病,与前额叶皮层、海马等关键脑区的神经发生障碍直接相关,神经活性配体-受体相互作用是神经系统信号传导,维持正常神经网络功能的基础条件^[30]。突触可塑性是大脑发挥学习、认知、记忆功能的基础,大量的研究报告表明神经突触可塑性降低,会损害神经回路调节的功能完整性,导致抑郁症的发病。钙离子浓度的降低与抑郁症患者脑区的神经发生、神经生理病理学改变关系密切,此外钙离子信号通路也参与了突触可塑性的调节^[31]。雌激素可参与大脑的认知、记忆、神经发育和神经可塑性,通过介导多个神经系统如多巴胺能和谷氨酸能系统来提高认知能力,改

善神经系统功能,近期雌激素的神经保护及抗炎作用备受关注^[32]。MAPK信号通路是信号传递网络中的重要途径之一,参与细胞的生长、分化、应激反应、炎症反应等,可接收细胞因子、神经递质、内分泌激素等多种细胞外刺激,大量实验数据表明MAPK信号通路干预参与了抑郁症的病理进程^[33-34]。细胞外信号调节激酶(ERK)是MAPK家族的亚型之一,抑郁患者的前额叶皮层及海马中的ERK表达量显著下降,而多种抗抑郁药通过逆转ERK的活性减轻抑郁样行为^[35]。此外MAPK信号干预调控了多种神经精神疾病中的神经退行性功能障碍^[36]。大量的临床和实验研究表明,抑郁症患者和动物的海马体及皮层的环磷酸腺苷(cAMP)信号通路被下调,抑郁症患者前额叶皮层的cAMP含量明显降低与抑郁患者自杀率升高呈密切相关关系^[37]。cAMP是细胞内参与调节物质代谢和生物学功能的重要物质,虚热状态下机体的代谢能增加,血清cAMP含量升高,此外cAMP作为细胞内的“第二信使”还可以介导神经递质、内分泌激素等信号传导^[27]。时钟基因构成的复杂网络能够调控机体的昼夜节律,参与调节免疫系统、炎症反应等抑郁症相关信号通路的传导。抑郁模型大鼠的时钟基因表达紊乱,昼夜节律失常,炎症小体数量骤增,大鼠前额叶与海马的炎症反应增强,抑郁状态进一步加剧^[38-39]。IL-17信号通路是经典的免疫炎症通路,神经系统炎症是抑郁症的发病机制之一,多项临床研究均表明抑郁症患者的IL-17表达量显著升高,抑制IL-17的mRNA表达可显著改善患者的抑郁症状^[40]。醛固酮是机体最重要的盐皮质激素,醛固酮分泌水平的增高和抑郁症焦虑等情绪密切相关^[41]。近年来研究发现肾素-血管紧张素-醛固酮系统参与激活了代谢综合征的演变过程,与机体的糖脂代谢功能紊乱和障碍密切相关^[42]。PTH主要用于控制钙稳态,维持机体细胞内钙离子浓度,调节内分泌系统功能^[43]。长期以来,过量的PTH浓度与神经精神障碍有关,大脑中的PTH2受体被PTH激活,能够调节多种神经和神经内分泌功能,尤其是抑郁症的内分泌激素水平^[44]。另有研究表明PTH能够参与调节ERK和MAPK信号途径促进细胞分化、凋亡^[45]。越来越多的证据表明在调节情绪的脑区中,谷氨酸能传递的长期突触变化能够破坏大脑情感稳态,维持正常的谷氨酸能突触传递,能够重塑神经网络功能,是治疗抑郁症的关键因素^[46]。神经营养因子是维持神经元生长、发育、再生和功能完整

性的先决条件,靶向干预神经营养因子及与神经营养因子相关的信号级联是治疗重度抑郁症的关键途径^[47]。抑郁症患者脑内的脑源性神经营养因子(BDNF)水平显著下降,神经突触可塑性降低,突触信号传递功能减弱,血清BDNF水平可作为诊断和治疗抑郁症的神经生物学标志物^[48]。BDNF的mRNA表达受神经传递及激素水平等多种功能的影响,BDNF在Glu能和GABA能神经突触的正常生长、发育和可塑性中发挥重要作用,并通过调节神经元分化影响多种单胺类神经递质的传递^[49]。

百合地黄汤干预模型后的显著差异表达基因KEGG富集分析与现代抑郁症的发病及治疗相关机制研究吻合。百合地黄汤主要通过干预神经系统、内分泌激素系统、代谢系统、炎症免疫系统来治疗阴虚内热型抑郁症。各个系统之间交互作用,形成一个复杂的网络机制,有待进一步地深入研究探讨各个系统之间的关键靶点及作用,以期对阴虚内热型抑郁症的实验研究及临床治疗提供更加科学有力的理论基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SERRETTI A, MANDELLI L, LATTUADA E, et al. Depressive syndrome in major psychoses: A study on 1 351 subjects [J]. *Psychiatry Res*, 2004, 127(1/2): 85-99.
- [2] HAMMEN C. Risk factors for depression: An autobiographical review [J]. *Annu Rev Clin Psychol*, 2018, 14: 1-28.
- [3] 马柯,张洪秀,宗鑫,等.百合地黄汤治疗抑郁症的研究进展[J]. *中成药*, 2019, 41(4): 874-878.
- [4] 陈建斌.李学铭分型论治抑郁症经验[J]. *浙江中医杂志*, 2017, 52(3): 157-158.
- [5] 张仲景. *金匱要略* [M]. 徐成贺,主编. 郑州:河南科学技术出版社, 2019: 68.
- [6] 王安冉. 百合病发病机制与治疗 [J]. *中医学报*, 2020, 35(2): 273-277.
- [7] MA K, WANG X, FENG S, et al. From the perspective of traditional Chinese medicine: Treatment of mental disorders in COVID-19 survivors [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110810.
- [8] 王兮. 百合地黄汤对阴虚型心理亚健康人群的临床干预研究 [D]. 太原:山西医科大学, 2014.
- [9] 于婉晨,王世军,季旭明,等. 薏苡仁水煎液对虚热大鼠模型能量代谢及相关基因表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8): 3693-3696.
- [10] 王雅泽,吕梦,赵迪,等. 基于功能药队分析策略和粗糙集理论的逍遥散改善大鼠抑郁样行为的配伍规律研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(22): 5760-5767.
- [11] 张慧玲,邱鹏,王花欣,等. 小鼠虚热证模型和虚寒证模型的生物学表达特征研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(3): 1516-1520.
- [12] HAN B B, WANG S J, WANG Y, et al. Gene expression profiling of rat livers with Yin-deficiency-heat syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(3): 378-383.
- [13] YU W C, ZHAO H J, ZONG X, et al. The effects of Radix Astragali water abstract on energy metabolism in rat Yang-deficiency cold syndrome model through PPAR signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 9194362.
- [14] 郭郁,许珂,包伍叶,等. 针刺对强迫游泳应激大鼠海马c-jun氨基末端激酶信号通路的影响 [J]. *针刺研究*, 2016, 41(1): 18-23.
- [15] GAN L, JIANG T T, YI W J, et al. Study on potential biomarkers of energy metabolism-related to early-stage Yin-deficiency-heat syndrome based on metabolomics and transcriptomics [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2020, 303(8): 2109-2120.
- [16] 叶耀辉. 虚热模型的研究进展 [J]. *江西中医药*, 2017, 48(5): 69-72.
- [17] 孙晓霞,任威铭,崔荣兴,等. 阴虚证动物模型的建立与评价 [J]. *中医杂志*, 2021, 62(13): 1156-1163.
- [18] 薛春苗,张冰,金锐,等. 糖皮质激素诱导大鼠不同状态下CYP3A和GST活性变化研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2011, 17(11): 1204-1206.
- [19] 倪莉,张冰,刘小青,等. 地塞米松磷酸钠诱导大鼠阴虚状态的实验研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(2): 355-358.
- [20] FANG H, TU S, SHENG J, et al. Depression in sleep disturbance: A review on a bidirectional relationship, mechanisms and treatment [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 2324-2332.
- [21] LINDQVIST D, DHABHAR F S, JAMES S J, et al. Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2017, 76: 197-205.
- [22] XU P Y, HUANG S J, ZHANG H B, et al. Structural insights into the lipid and ligand regulation of serotonin receptors [J]. *Nature*, 2021, 592(7854): 469-473.
- [23] LI N, LIU J, WANG M, et al. Sedative and hypnotic effects of schisandrin B through increasing GABA/Glu ratio and upregulating the expression of GABAA in mice and rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 509-516.
- [24] LI Y F. A hypothesis of monoamine (5-HT) - Glutamate/GABA long neural circuit: Aiming for fast-onset antidepressant discovery [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 213: 107707.

- 2020,208:107494.
- [25] KOHLER O, KROGH J, MORS O, et al. Inflammation in depression and the potential for anti-inflammatory treatment [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14 (7) : 732-742.
- [26] 刘亚梅. 实热证、虚热证在机体能量代谢方面的对比研究[D]. 广州:广州中医药大学,2000.
- [27] 张慧玲,邱鹏,王花欣,等. 小鼠虚热证模型和虚寒证模型的生物学表达特征研究[J]. *中华中医药杂志*, 2020,35(3):1516-1520.
- [28] LIYANARACHCHI K, ROSS R, DEBONO M. Human studies on hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2017, 31(5):459-473.
- [29] PETRAK F, BAUMEISTER H, SKINNER T C, et al. Depression and diabetes: treatment and health-care delivery[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, 3(6) : 472-485.
- [30] KORNIJCUK V, KIM D, KIM G, et al. Simplified calcium signaling cascade for synaptic plasticity [J]. *Neural Netw*, 2020, 123:38-51.
- [31] HWANG W J, LEE T Y, KIM N S, et al. The role of estrogen receptors and their signaling across psychiatric disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22 (1):373.
- [32] LAI J L, LIU Y H, LIU C, et al. Indirubin inhibits LPS-induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2017, 40(1) : 1-12.
- [33] NAVARRETE M, CUARTERO M I, PALENZUELA R, et al. Astrocytic p38 α MAPK drives NMDA receptor-dependent long-term depression and modulates long-term memory[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):2968.
- [34] WANG J Q, MAO L. The ERK pathway: Molecular mechanisms and treatment of depression [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(9) : 6197-6205.
- [35] LEE J K, KIM N J. Recent advances in the inhibition of p38 MAPK as a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Molecules*, 2017, 22 (8) : 1287.
- [36] FALCICCHIA C, TOZZI F, ARANCIO O, et al. Involvement of p38 MAPK in synaptic function and dysfunction[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16) : 5624.
- [37] 乐娜,周雪,费文婷,等. 玛咖对虚寒及虚热证大鼠环核苷酸水平及神经-内分泌-免疫网络的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(5) : 1004-1010.
- [38] WANG S, LIN Y, YUAN X, et al. REV-ERB α integrates colon clock with experimental colitis through regulation of NF- κ B/NLRP3 axis[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1) : 4246.
- [39] POURCET B, ZECCHIN M, FERRI L, et al. Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 regulates circadian activity of NLRP3 inflammasome to reduce the severity of fulminant hepatitis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(5) : 1449-1464.
- [40] BZNIIEWSKA K, SZEWCZYK B, GALECKA M, et al. Is interleukin 17 (IL-17) expression A common point in the pathogenesis of depression and obesity[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(9) : 4018.
- [41] MURCH H, SCHLAGETER L, SCHNEIDER A, et al. The potential pathophysiological role of aldosterone and the mineralocorticoid receptor in anxiety and depression-lessons from primary aldosteronism [J]. *J Psychiatr Res*, 2020, 130: 82-88.
- [42] CABANDUGAMA P K, GARDNER M J, SOWERS J R. The renin angiotensin aldosterone system in obesity and hypertension: Roles in the cardiorenal metabolic syndrome [J]. *Med Clin North Am*, 2017, 101 (1) : 129-137.
- [43] LOMBARDI G, ZIEMANN E, BANFI G, et al. Physical activity-dependent regulation of parathyroid hormone and calcium-phosphorous metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15) : 5388.
- [44] USDIN T B, WANG T, HOARE S R, et al. New members of the parathyroid hormone/parathyroid hormone receptor family: The parathyroid hormone 2 receptor and tuberoinfundibular peptide of 39 residues [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2000, 21(4) : 349-383.
- [45] GE X, LI Z, JING S, et al. Parathyroid hormone enhances the osteo/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells via ERK and P38 MAPK pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235 (2) : 1209-1221.
- [46] VOSE L R, STANTON P K. Synaptic plasticity, metaplasticity and depression [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15(1) : 71-86.
- [47] SCHMIDT H D, BANASR M, DUMAN R S. Future antidepressant targets: Neurotrophic factors and related signaling cascades[J]. *Drug Discov Today Ther Strateg*, 2008, 5(3) : 151-156.
- [48] PENG S Y, Li W Q, LV L X, et al. BDNF as a biomarker in diagnosis and evaluation of treatment for schizophrenia and depression[J]. *Discov Med*, 2018, 26(143) : 127-136.
- [49] COLUCCI-D'AMATO L, SPERANZA L, VOLPICELLI F. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20) : 7777.

[责任编辑 顾雪竹]