

· 数据挖掘 ·

基于RNA-Seq探讨毛蕊花糖苷抗抑郁的作用机制

薛晓燕¹, 潘瑾¹, 施会山¹, 王塘¹, 吴江¹, 高志礼¹, 毛前程¹, 钟桦林¹, 马婷^{1*}, 马柯^{1,2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355;

2. 山东中医药大学山东省中医经典名方协同创新中心, 济南 250355)

[摘要] 目的: 基于高通量测序技术(RNA-Seq)探讨毛蕊花糖苷抗抑郁作用机制, 探讨可能作用靶点及信号通路。方法: 将40只C57BL/6小鼠随机分为空白组、模型组、氟西汀组及毛蕊花糖苷组, 每组10只。除空白组外, 其他3组均采用慢性不可预知温和应激(CUMS)结合孤养方式构建抑郁模型, 于造模第2周分别给予生理盐水、氟西汀(20 mg·kg⁻¹)、毛蕊花糖苷(60 mg·kg⁻¹)灌胃, 边造模边给药持续3周。通过行为学检测评估小鼠抑郁样状态; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清中主要神经递质及炎症因子含量; 小鼠伏隔核及结肠进行mRNA高通量测序, 筛选差异表达基因, 进行通路富集分析, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测伏隔核组织中主要差异基因谷氨酸脱羧酶1(Gad1)、溶质载体家族32成员1(Slc32a1, 又名VGAT)、脑源性神经营养因子(BDNF)的mRNA表达。结果: 与空白组比较, 模型组焦虑、抑郁样行为增加, 学习记忆能力显著降低($P<0.01$); 血清中神经递质含量明显降低($P<0.05$); 促炎性因子含量明显升高($P<0.05$); 伏隔核组织中Gad、Slc32a1(VGAT)的mRNA表达量明显下降($P<0.05$), BDNF的mRNA表达量明显升高($P<0.05$)。与模型组比较, 毛蕊花糖苷组小鼠焦虑抑郁样行为显著缓解($P<0.01$); 神经递质含量明显增加($P<0.05$), 促炎性因子明显降低($P<0.05$); 伏隔核组织中Gad、Slc32a1(VGAT)的mRNA表达量明显升高($P<0.05$), BDNF的mRNA表达量显著下降($P<0.01$)。高通量测序共筛选出伏隔核差异表达基因48个, 结肠差异表达基因43个。伏隔核差异基因主要集中在神经活性配体-受体相互作用、 γ 氨基丁酸(GABA)能突触、突触小泡循环等通路; 结肠差异基因主要富集在GABA能突触、突触小泡循环、环磷酸腺苷(cAMP)等信号通路。结论: 毛蕊花糖苷具有明显抗抑郁作用。其抗抑郁功效可能与单胺类神经递质增加、促炎因子减少以及通过增加GABA恢复神经递质平衡有关, 并主要通过神经活性配体-受体相互作用、GABA能突触、突触小泡循环、cAMP信号通路等信号通路起作用。

[关键词] 抑郁; 毛蕊花糖苷; 高通量测序技术(RNA-Seq); 脑肠轴; 伏隔核

[中图分类号] R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)14-0148-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220618

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220316.1138.001.html>

[网络出版日期] 2022-03-18 8:51

Analysis on Antidepressant Mechanism of Verbascoside Based on RNA-Seq Technology

XUE Xiaoyan¹, PAN Jin¹, SHI Huishan¹, WANG Yong¹, WU Jiang¹, GAO Zhili¹, MAO Qiancheng¹,

ZHONG Hualin¹, MA Ting^{1*}, MA Ke^{1,2*}

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

2. Shandong University of TCM, Shandong Co-Innovation Center of Classic TCM Formula, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of antidepressant effect of verbascoside based on high-throughput sequencing technology (RNA-Seq), and to explore the possible targets and signaling pathways. **Methods:** Forty C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, fluoxetine group and verbascoside group, 10 mice in each group. Except for the control group, all the other three groups were

[收稿日期] 2021-12-13

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81903948)

[第一作者] 薛晓燕, 在读硕士, 从事中医治疗情志病研究, E-mail: xuecc1106@163.com

[通信作者] * 马婷, 博士, 教授, 从事中医方剂理论与应用研究, Tel: 0531-89628060, E-mail: mastertm77@sina.com;

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

constructed with chronic unpredictable mild stimulation (CUMS) combined with solitary feeding for four weeks. Control group, fluoxetine group and verbascoside group were administered by gavage once daily for three weeks during the second week of modeling. The mice were assessed by sugar-water preference test, forced swimming test, open field test, elevated cross maze test, and water maze test. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect the levels of major neurotransmitters and inflammatory factors in mice serum, and mRNA high-throughput sequencing was performed in the nucleus accumbens and colon to screen differentially expressed genes and perform pathway enrichment analysis. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression of Gad, Slc32a1 (VGAT) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in nucleus accumbens. **Result:** Compared with the control group, the anxiety and depression-like behaviors in the model group increased, while the learning and memory ability decreased significantly. The content of neurotransmitter in serum decreased significantly. The content of pro-inflammatory factors increased significantly. The mRNA expression of Gad and Slc32a1 (VGAT) in nucleus accumbens decreased significantly, while that of BDNF increased significantly. Compared with the model group, the anxiety and depression-like behavior of mice in verbascoside group was significantly relieved. The neurotransmitter content increased significantly, and the pro-inflammatory factors decreased significantly. The mRNA expression of Gad and Slc32a1 (VGAT) in nucleus accumbens increased significantly, while that of BDNF decreased significantly. A total of 48 differentially expressed genes in nucleus accumbens and 43 differentially expressed genes in colon were screened by high-throughput sequencing. Differential genes in nucleus accumbens mainly focus on neuroactive ligand-receptor interaction, γ -aminobutyric acid (GABA)ergic synapse, synaptic vesicle cycle and other pathways. Colonic differential genes are mainly concentrated in GABAergic synapses, synaptic vesicle circulation, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signal pathway and other signal pathways. Compared with the control group, the mRNA expression of Gad and Slc32a1 (VGAT) in nucleus accumbens of model group decreased significantly, while the mRNA expression of BDNF increased significantly. **Conclusion:** Verbascoside has significant antidepressant effects. Its antidepressant effect may be related to the increase of monoamine neurotransmitters, the decrease of pro-inflammatory factors and the restoration of neurotransmitter homeostasis by increasing GABA, and it mainly acts through the signaling pathways such as neuroactive ligand-receptor interaction, GABAergic synapses, synaptic vesicle cycle and cAMP signaling pathway.

[Keywords] depression; verbascoside; high-throughput sequencing technology (RNA-Seq); brain-gut axis; nucleus accumbens

抑郁症是一种多维度、高度异质性情绪障碍疾病,严重危害患者身心健康,降低生活质量,增加社会负担^[1]。在全球新冠肺炎疫情大流行下,由于“新冠期间行为的限制和心理负担”更易诱发机体处于焦虑、恐惧、忧虑过度等负面精神状态,导致抑郁发作。因此,抑郁症有效防治工作已成为社会和医学界广为关注、亟需解决的问题。

抑郁症病因复杂、发病机制存在多种假说,单胺类递质分泌降低、下丘脑-垂体-肾上腺轴紊乱、突触可塑性降低、大脑皮层和边缘系统的结构功能环路异常等^[2],据此研发的各类抗抑郁药物仅使部分患者受益,且存在临床症状改善缓慢、易复发及副作用多等缺陷。近几年,国内外学者从“中医整体观”的视角重新审视抑郁症,聚焦“全身机体微生态

菌群失调、神经内分泌网络失衡、神经环路异常、脑-肠对话”等多系统交互作用在脑部的特征性表现探究抑郁症发作机制及新型抗抑郁药物研发。

传统中医虽无抑郁症之名,但古籍文献可见与其相近描述,如《金匱要略》中所记载百合病,“百合病者,百脉一宗,悉致其病也。意欲食,复不能食,常默然,欲卧不能卧,欲行不能行;饮食或有美时,或有不用闻食臭时;如寒无寒,如热无热;口苦,小便赤;诸药不能治,得药则剧吐利。如有神灵者,而身形如和,其脉微微”,症状表现与抑郁症临床症状相似^[3]。治当清心润肺、滋阴安神,方用百合地黄汤。现代临床实践及基础研究证实百合地黄汤治疗抑郁症^[4-5]、失眠障碍^[6]、焦虑症^[7-8]、创伤后应激障碍^[9-10]效果显著。近期笔者探究百合地黄汤多组分

抗抑郁药理机制发现,毛蕊花糖苷不仅可作为质量标记物,也可作为其有效成分^[11-12]。众多研究表明毛蕊花糖苷具有抗肿瘤^[13-14]、抗炎^[15-16]、神经保护^[17-18]、皮肤保护^[19-20]、抗病原微生物^[21-22]等多种药理作用。然而,基于“脑-肠交互对话”、整体观的毛蕊花糖苷抗抑郁药理机制尚未阐明。

因此本实验主要通过慢性不可预知温和应激法(CUMS)结合孤养的方式建立抑郁症小鼠模型,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清中神经递质及炎症因子表达水平,分别通过伏隔核、结肠mRNA高通量测序(RNA-Seq)筛选差异基因并分析主要通路,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测组织主要差异表达基因。旨在探讨毛蕊花糖苷抗抑郁作用的关键基因及信号通路,以期为临床应用奠定坚实的理论基础。

1 材料

1.1 动物 SPF级C57BL/6小鼠40只,雄性,5周龄,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)2021-0006,此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)。小鼠自由进食及饮水,适应性饲养1周。

1.2 试剂 毛蕊花糖苷购自南京景竹生物科技有限公司(HPLC>98%,批号Z100401);Real-time PCR试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号043021211213),盐酸氟西汀分散片(礼来苏州制药有限公司,国药准字J20160029),TRIzol(美国Ambion公司,批号262306),小鼠 γ 氨基丁酸(美国GABA公司,批号JM-02725M1),5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-10 ELISA试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,批号分别为JM-02459M1、JM-0206M1、JM-02323M1、JM-02446M1、JM-02459M1)。

1.3 仪器 63008型旷场、63010型高架十字迷宫、63022型强迫游泳、DB001型Morris水迷宫、SMART 3.0型动物行为学视频分析系统(深圳市瑞沃德生命科技有限公司),5427R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司),788BR07377型PCR(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 动物分组 适应性饲养1周后,随机将小鼠分为空白组、模型组、氟西汀组、毛蕊花糖苷组,每组10只。

2.2 抑郁症模型建立 采用CUMS结合孤养方式

构建小鼠抑郁模型^[23]。具体刺激包括禁食禁水(24 h)、空瓶刺激(12 h)、脏笼(8 h)、空间束缚(3 h)、倾斜笼(12 h)、湿笼(12 h)、强迫运动(3 h)。每天随机安排2种刺激,保证相邻2 d刺激不重复,造模时间持续4周。

2.3 给药方法 造模1周后给予灌胃。按照人与小鼠体表面积换算药物等效剂量,其中氟西汀组以20 mg·kg⁻¹灌胃,毛蕊花糖苷组给60 mg·kg⁻¹灌胃,给药剂量参考文献^[24-25]。空白组及模型组给予等体积的生理盐水灌胃,每天1次,灌胃与造模同时持续3周,结束后进行行为学检测。

2.4 行为学评价

2.4.1 糖水偏好实验 给予每笼小鼠1瓶1%蔗糖水和1瓶普通水,适应24 h,中间12 h将2瓶水位置调换。结束后第2天小鼠禁水但不禁食4 h后,将1瓶1%蔗糖水和1瓶普通水称重后放置,3 h将位置调换,小鼠自由饮水6 h后,将2个水瓶称质量。统计糖水摄入量,糖水偏好度=糖水摄入量/(普通水摄入量+糖水摄入量)×100%。

2.4.2 强迫游泳 将小鼠轻放入塑料桶中,桶内装有23~24℃温水,小鼠适应30 s后,记录小鼠4 min的挣扎情况。测试结束后将小鼠擦干并给予保温措施。对小鼠4 min挣扎、漂浮、不动时间进行统计。

2.4.3 旷场实验 小鼠在旷场箱中自由活动30 s后,记录4 min内小鼠在旷场箱内活动总距离以及中间停留时间。每只小鼠实验结束后,清除粪便并用75%乙醇擦拭旷场箱,避免遗留气味干扰后续实验。

2.4.4 十字高架迷宫 将小鼠头朝闭臂放入高架十字迷宫中心,小鼠自由活动30 s后,记录4 min内小鼠进入开臂的探索时间。每只小鼠实验结束后,用75%乙醇擦拭实验区域。

2.4.5 水迷宫 将圆形水池中注入22~23℃温水,用安全无毒染料染为白色。水迷宫分为东西南北4个象限。在西侧象限距离水池壁25 cm处放置1个直径10 cm的平台,没入水下2 cm。分别将小鼠从不同象限放入水中,记录小鼠找到平台时间,若60 s内未找到平台,则将小鼠引导至平台10,持续4 d时间。第5天进行认知功能测定,撤去平台,将小鼠从任一象限放入水中,停留60 s,记录小鼠经过平台位置的时间。

2.5 ELISA检测小鼠血清神经递质及炎症因子的表达 取小鼠眼眶血,4℃、3 000 r·min⁻¹离心

10 min,离心半径10 cm,获得血清。采用ELISA试剂盒检测血清中GABA、5-HT、DA、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量,具体实验步骤严格试剂盒说明书操作。

2.6 小鼠伏隔核、结肠 mRNA 高通量测序及差异基因的筛选 小鼠麻醉后处死,断头取伏隔核及结肠,采集样本置于液氮速冻备用,后取单个样本50 mg,TRIzol 法提取总 RNA。提取总 RNA 分为两部分,一部分用于 mRNA 高通量测序,由深圳华大基因科技服务有限公司提供。筛选出总 RNA 量>10 μ g、质量浓度>200 mg·L、RIN \geq 8、28S/18S \geq 1.5 的样品用于构建转录组。

2.7 mRNA 生物信息学分析 对测序得到的序列数据 raw reads 进行质控(QC),后经过滤后得到干净片段(clean data)。对模型组与空白组比较、毛蕊花糖苷组与模型组比较,进行差异基因的筛选,标准为 FPKM>0、Flod change \geq 1.5、 $P<0.05$ 为差异表达基因,并对差异基因进行 KEGG 通路富集分析。

2.8 Real-time PCR 检测小鼠伏隔核组织中主要差异基因 mRNA 表达 将 2.6 项下提取得到的伏隔核 RNA 用于 Real-time PCR 检测。Real-time PCR 反应条件为 50 $^{\circ}$ C 反转录 20 min;95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s,40 个循环。 β -肌动蛋白(actin)作为内参,目的基因相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。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	长度/bp
Gad1	上游 5'-GGGCTATGTTCCCTTTATGT-3'	184
	下游 5'-CCTTTCTATGCCGCTGAGT-3'	
VGAT	上游 5'-TGGTCATCGCTTACTGTCTC-3'	157
	下游 5'-TGCTGCATGTTGCCTTCG-3'	
BDNF	上游 5'-TTATTTTCATACTTCGGTTGC-3'	166
	下游 5'-ATGGGATTACACTTGGTCTC-3'	

2.7 统计学分析 采用 SPSS 22.0 进行分析,实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间比较采用随机单因素方差分析(One-way ANOVA), $P<0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 毛蕊花糖苷对 CUMS 诱导小鼠行为学改变

3.1.1 毛蕊花糖苷改善 CUMS 诱导小鼠抑郁样行为 与空白组比较,模型组小鼠糖水摄入量明显降低,强迫游泳实验中不动时间显著增多($P<0.01$),小鼠快感缺失明显及行为绝望增加,模型组有明显的抑郁样特征;毛蕊花糖苷干预后,与模型组比较,糖水摄入量明显恢复,强迫游泳实验中不动时间显著缩短($P<0.01$),表明其快感及行为绝望恢复,提示毛蕊花糖苷可明显改善 CUMS 诱导小鼠抑郁样行为。见表 2。

表 2 毛蕊花糖苷对抑郁样小鼠行为学影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of verbascoside on behavior of depression-like mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	糖水/%	强迫游泳/s	旷场/%	高架/%	水迷宫/s
空白组		76.68 \pm 1.20	27.62 \pm 6.79	11.04 \pm 0.75	10.08 \pm 0.87	3.30 \pm 1.17
模型组		56.12 \pm 2.23 ¹⁾	63.84 \pm 5.67 ¹⁾	3.86 \pm 0.74 ¹⁾	2.75 \pm 0.37 ¹⁾	0.70 \pm 0.16 ¹⁾
氟西汀组	20	67.35 \pm 2.93 ²⁾	32.72 \pm 5.93 ²⁾	7.05 \pm 0.66 ²⁾	5.35 \pm 0.69 ²⁾	2.02 \pm 0.47 ²⁾
毛蕊花糖苷组	60	67.26 \pm 1.74 ²⁾	30.19 \pm 5.12 ²⁾	8.32 \pm 0.60 ²⁾	4.24 \pm 0.48 ²⁾	1.97 \pm 0.77 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$,与模型组比较²⁾ $P<0.01$

3.1.2 毛蕊花糖苷改善 CUMS 诱导小鼠焦虑样行为 与空白组比较,旷场实验及高架十字迷宫实验中,小鼠在中心区域及开放臂中的探索时间显著减少($P<0.01$),表明小鼠焦虑样行为明显;毛蕊花糖苷干预后,小鼠在中心区域及开放臂中的探索时间显著提高($P<0.01$),表明毛蕊花糖苷可明显改善小鼠焦虑样行为。见表 2。

3.1.3 毛蕊花糖苷改善 CUMS 诱导小鼠学习记忆能力 水迷宫实验结果表明,前 4 天获得性训练结束后,记录第 5 天认知功能,撤去平台后,空白组小鼠反复穿过平台次数较多,模型组小鼠与空白组比

较,无目的运动较多,穿越平台位置次数明显减少($P<0.01$)。而毛蕊花糖苷干预后,与模型组相比,穿越平台次数显著增加($P<0.01$),毛蕊花糖苷可明显改善小鼠学习记忆能力。见表 2。

3.2 毛蕊花糖苷对 CUMS 诱导抑郁样小鼠血清神经递质及炎性因子的影响^[26] 与空白组比较,模型组小鼠血清中 5-HT、GABA、DA 含量明显降低($P<0.05$);IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量明显上升($P<0.05$)。与模型组相比,毛蕊花糖苷组小鼠血清中 5-HT、GABA、DA 含量明显提高($P<0.05$);IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量明显降低($P<0.05$)。见表 3。

表3 毛蕊花糖苷对抑郁样小鼠血清神经递质及炎症因子的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effects of verbascoside on serum neurotransmitters and inflammatory factors in depressed mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	5-HT/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	GABA/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	DA/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-1 β / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-6/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
空白组		461.81±35.43	10.12±0.64	48.63±5.14	99.62±4.70	18.99±1.53	893.69±27.24
模型组		403.96±24.78 ¹⁾	9.33±0.56 ¹⁾	38.72±0.80 ¹⁾	109.63±5.02 ¹⁾	22.41±2.39 ¹⁾	937.87±33.44 ¹⁾
毛蕊花糖苷组	60	455.78±39.55 ²⁾	9.98±0.33 ²⁾	46.74±4.29 ²⁾	102.66±2.45 ²⁾	18.11±2.93 ²⁾	878.48±42.76 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$

3.3 毛蕊花糖苷干预后伏隔核、结肠差异基因表达以及信号通路分析 伏隔核共得到48个差异基因,其中谷氨酸脱羧酶1(Gad1)、降钙素相关多肽 β (Calcb)、溶质载体有机阴离子转运蛋白家族成员1b2(Slco1b2)等mRNA在毛蕊花糖苷组中上调,水通道蛋白1(Aqp1)、睫状神经营养因子(Cntf)、神经肽Y受体Y2(Npy2r)等mRNA在毛蕊花糖苷组中下调,见增强出版附加材料。结肠共得到43个差异基因,其中Gad1、溶质载体家族32成员1(Slc32a1,又名VGAT)、再生胰岛衍生的 3γ (Reg3g)等在毛蕊花糖苷组中上调,神经元五聚蛋白染色体结构域(Npcd)、转甲状腺素蛋白(Ttr)、G蛋白信号调节器8(Rgs8)等在毛蕊花糖苷组中下调。其中伏隔核差异基因主要富集在神经活性配体/受体相互作用、GABA能突触、cAMP信号通路等通路;结肠差异基因主要富集在神经活性配体/受体相互作用、GABA能突触、突触小泡循环等信号通路。见表4。

3.4 伏隔核与结肠共同差异基因分析 将伏隔核48个差异基因与结肠43个差异基因取交集,得到Gad1、Slc32a1(VGAT)、BDNF、Gabre、Htr1b等5个共同差异基因,其中Gad1、Slc32a1(VGAT)在伏隔核及结肠中,模型组中表示下调,毛蕊花糖苷干预后上调;BDNF、Htr1b在伏隔核及结肠中,模型组中表示上调,毛蕊花糖苷干预后下调;Gabre在伏隔核中的模型组中上调,毛蕊花糖苷干预后下调,但在结肠中的模型组中下调,毛蕊花糖苷干预后上调。

3.5 伏隔核组织中主要差异基因mRNA表达 与空白组比较,模型组小鼠伏隔核组织中Gad1、Slc32a1(VGAT)表达量明显下降,BDNF表达量明显上升;与模型组比较,毛蕊花糖苷组小鼠伏隔核组织中Gad1、Slc32a1(VGAT)表达量明显升高,BDNF表达量显著下降,见表5。

4 讨论

抑郁症是目前主要的公共卫生问题,是世界上第三大残疾原因,世界终生患病率为20%^[27]。其病因复杂,发病机制尚不明确,主要涉及大脑功能障碍、下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴、免疫系统和脑-肠

轴4个方面的功能障碍^[28],大脑功能障碍主要表现为神经递质失衡、神经可塑性受损、神经环路异常等;HPA轴功能障碍主要表现为负反馈机制失调;免疫变化主要表现为慢性炎症;脑肠功能障碍主要包括胃肠道疾病和肠道菌群异常等。抑郁症作为全身性疾病,HPA轴、脑肠轴、神经环路、炎症反应等多系统多层次互相影响、互相作用。

本研究采用经典CUMS结合孤养方式构建抑郁模型,采用糖水偏好实验、强迫游泳实验评价小鼠抑郁样行为;旷场实验、十字高架迷宫是实验评价小鼠焦虑样行为;水迷宫实验评价小鼠学习能力。实验结果表明,毛蕊花糖苷可显著恢复小鼠快感、行为绝望得到明显缓解、探索及学习能力显著恢复,表明毛蕊花糖苷具有明显抗抑郁效果。

单胺类神经递质假说认为,5-HT、DA缺乏是抑郁症发生发展的重要基础之一^[29]。炎症也是抑郁症的一个重要病理特征,一部分抑郁症患者存在免疫失调和慢性炎症^[30]。细胞因子假说认为,在抑郁症中,促炎细胞因子IL-6、IL-1 β 和TNF- α 含量增加,整体免疫反应趋于炎症。过多的促炎细胞因子抑制HPA轴的负反馈,增加血脑屏障的通透性,减少5-HT的合成,扰乱谷氨酸能系统,导致抑郁发生^[31]。实验结果表明,模型组小鼠血清中神经递质5-HT、DA、GABA较空白组显著降低,而促炎因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平较空白组显著升高。毛蕊花糖苷干预后,血清中神经递质及促炎因子水平得到逆转。说明毛蕊花糖苷抗抑郁功效可能与单胺类神经递质增加、促炎因子减少以及通过增加GABA恢复神经递质平衡有关。

脑肠轴是大脑与胃肠道相互作用的双向调节轴,越来越多研究表明,抑郁症与脑肠轴关系密切^[32-34],抑郁症患者常有肠道脑功能障碍,如食欲障碍、代谢障碍、功能性胃肠道疾病和肠道微生物群异常等^[35]。肠道和脑之间通过涉及神经、内分泌和免疫机制的通路进行双向沟通;肠道屏障和血脑屏障通透性的变化也会影响脑-肠轴;肠道菌群亦在其

表4 差异基因主要富集通路

Table 4 Main KEGG pathway of differential genes

通路ID	通路名称	基因数/个	富集基因	P _{value}	组织
04080	神经活性配体/受体相互作用	14	胆碱能受体烟碱β多肽3(Chrn3)↑、胆碱能受体烟碱β多肽5(Chrna5)↑、肾上腺素受体α1d(Adra1d)↑、Calcb↑、促肾上腺皮质激素释放激素(Crh)↓、γ氨基丁酸A受体ε亚基(Gabre)↓、生长激素释放激素(Ghrh)↓、5-HT受体1B(Htr1b)↓、Npy2r↓、催乳素受体(Prlr)↓、促甲状腺素释放激素(Trh)↓、血管活性肠肽受体2(Vipr2)↓、伪君子受体2(Hertr2)↓、γ-氨基丁酸A受体θ亚基(Gabrq)↓	7.93×10 ⁻¹²	伏隔核
04727	GABA能突触	4	Gabre↓、Gad1↑、Slc32a1↑、Gabrq↓	3.14×10 ⁻⁴	伏隔核
04024	cAMP信号通路	3	脑源性神经营养因子(BDNF)↓、Htr1b↓、Vipr2↓	4.67×10 ⁻²	伏隔核
04630	JAK/STAT信号通路	3	Cntf↓、Prlr↓、白细胞介素-27受体α(Ii27ra)↑	2.39×10 ⁻²	伏隔核
05032	吗啡成瘾	3	Gabre↓、Slc32a1↑、Gabrq↓	4.76×10 ⁻³	伏隔核
04721	突触小泡循环	2	溶质载体家族17成员6(Slc17a6)↓、Slc32a1(VGAT)↑	3.32×10 ⁻²	伏隔核
04917	催乳素信号通路	2	雌激素受体2(Esr2)↓、Prlr↓	3.00×10 ⁻²	伏隔核
04924	肾素分泌	2	水通道蛋白1(Aqp1)↓、氯化物通道附件3a1(Clca3a1)↓	3.32×10 ⁻²	伏隔核
04976	胆汁分泌	2	Aqp1↓、Slco1b2↑	3.00×10 ⁻²	伏隔核
00430	牛磺酸和亚牛磺酸代谢	1	Gad1↑	4.08×10 ⁻²	伏隔核
04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	6	Gabre↓、谷氨酸受体离子型NMDA2B(Grin2b)↓、Htr1b↓、5-HT受体4(Htr4)↓、胰多肽(Ppy)↓、瞬时受体电位阳离子通道亚科V成员1(Trpv1)↓	4.35×10 ⁻⁴	结肠
04727	GABAergic synapse	5	Gabre↓、溶质载体家族6成员12(Slc6a12)↓、Gad1↑、Slc32a1(VGAT)↑、Slc6a11↑	4.89×10 ⁻⁶	结肠
04721	Synaptic vesicle cycle	4	Slc6a12↓、溶质载体家族1成员2(Slc1a2)↑、Slc32a1(VGAT)↑、溶质载体家族6成员11(Slc6a11)↑	6.58×10 ⁻⁵	结肠
04024	cAMP signaling pathway	4	BDNF↓、Grin2b↓、Htr1b↓、Htr4↓	3.37×10 ⁻³	结肠
05033	尼古丁成瘾	3	Gabre↓、Grin2b↓、Slc32a1(VGAT)↑	2.09×10 ⁻⁴	结肠
05014	肌萎缩侧索硬化症	3	Grin2b↓、Slc1a2↑、Tnf↑	4.32×10 ⁻⁴	结肠
04930	II型糖尿病	2	ATP结合盒亚家族C成员8(Abcc8)↑、Tnf↑	8.69×10 ⁻³	结肠
05030	可卡因成瘾	2	BDNF、Grin2b↓	8.69×10 ⁻³	结肠
05144	疟疾	2	血小板反应蛋白4(Thbs4)↓、Tnf↑	1.17×10 ⁻²	结肠
04940	I型糖尿病	2	Gad1↑、Tnf↑	1.69×10 ⁻²	结肠

注: ↑表示差异基因在毛蕊花糖苷组中表示上调; ↓表示差异基因在毛蕊花糖苷组中表示下调

表5 毛蕊花糖苷对抑郁小鼠伏隔核组织Gad1、Slc32a1(VGAT)、BDNF mRNA的影响(̄x±s, n=4)

Table 5 Effect of verbascoside on relative expression of Gad1, Slc32a1(VGAT), BDNF mRNA in nucleus accumbens of depressed mice(̄x±s, n=4)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Gad1	Slc32a1(VGAT)	BDNF
空白组		1.00±0.08	1.00±0.21	1.00±0.22
模型组		0.70±0.29 ¹⁾	0.78±0.09 ¹⁾	2.84±1.04 ¹⁾
毛蕊花糖苷组	60	1.80±0.82 ²⁾	1.22±0.44 ²⁾	0.57±0.30 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾P<0.05; 与模型组比较²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01

中扮演重要角色^[36]。伏隔核是奖赏环路的重要组成部分^[37], 研究表明伏隔核参与奖励、动机、学习、

摄食、成瘾和情感障碍等, 而抑郁症患者快感缺失、兴趣丧失及缺乏动力的症状与伏隔核有关, 且快感缺失的症状也表明抑郁症与大脑奖赏环路之间的重要联系, 尤其是其组成部分伏隔核区域^[38]。伏隔核中98%是GABA能多棘神经元^[39], GABA能神经元的损伤与抑郁症有关。此外伏隔核接收腹侧被盖区的多巴胺神经元发出的投射纤维, 同时也接受来自前额叶、海马、杏仁核的谷氨酸能神经元的投射, 体现出伏隔核作为皮质边缘回路不可或缺的中枢作用^[38]。实验表明, 参与奖赏机制的伏隔核与结肠有密切关联, 结肠产生的短链脂肪酸(SCFAs)丙酸盐通过中枢神经系统调节进食行为, BYRNE等^[40]实验结果表明, 结肠丙酸盐可能通过大脑纹状

体(伏隔核)通路在食欲和基于奖励的饮食行为中发挥重要作用;NETTLETON等^[41]实验结果认为,甜叶菊主要活性成分莱菔迪苷A的摄入会扰乱肠道微生物群和中脑边缘多巴胺奖励系统,降低伏隔核的酪氨酸羟化酶和多巴胺转运体 mRNA 水平;AGUSTÍ等^[42]实验结果表明,在大鼠食物成瘾模型中施用统一拟杆菌会影响大脑伏隔核介导的奖励反应,改善暴食并减少焦虑样行为。

基于此,本实验选择伏隔核及结肠进行 mRNA 高通量测序,筛选差异表达基因,并对差异基因进行通路富集分析。伏隔核差异基因主要富集在神经活性配体/受体相互作用、GABA 能突触、cAMP 信号通路等通路;结肠差异基因主要富集在神经活性配体-受体相互作用、GABA 能突触、突触小泡循环等信号通路。神经活性配体-受体相互作用信号通路与神经功能直接相关,通过与细胞内受体结合来影响神经元功能,细胞内受体具有结合转录因子和调节基因表达的能力,破坏参与神经活性配体-受体相互作用的基因会导致记忆功能下降^[43]。GABA 能突触通路主要富集 Gabre、Gad1、Slc32a1 (VGAT)、Gabrq 4 个差异基因。GABA 是哺乳动物中枢神经系统中最主要的抑制性神经递质,由 GABA 能中间神经元释放。GABA 能中间神经元和谷氨酸能锥体神经元构成了主要抑制性和兴奋性平衡系统。GABA 在突触前膜内由谷氨酸在谷氨酸脱羧酶(GAD)的作用下代谢转化而来,GABA 经囊泡转运体(VGAT)转运进入并存储于囊泡,在神经兴奋时被释放进入突触间隙,并经膜转运体(GAT)重摄取回收突触间隙 GABA^[44]。因此,抑郁症的发生发展与 GABA 能系统影响脑功能及行为密切相关。目前常用的以 5-HT 能系统为靶标的抗抑郁药物最终通过影响 GABA 能系统活动发挥疗效^[45]。cAMP 信号通路在情绪调节和学习记忆的形成中发挥关键作用,是研究得最早、最为深入的抗抑郁信号通路^[46],其级联反应的大致过程为腺苷酸环化酶(AC)活化,催化 ATP 水解生成 cAMP,激活 PKA (蛋白激酶 A),使 PKA 磷酸化激活 CREB (cAMP 反应元件结合蛋白)信号转导通路,将细胞外信号传递到细胞内,改变功能蛋白活性和基因表达模式,形成新的突触,从而发挥抗抑郁作用^[47]。突触小泡是贮存和释放递质的场所。突触小泡蛋白是突触前膜囊泡上的一种膜蛋白,是突触囊泡中含量最为丰富的蛋白之一,担负着神经递质的包装、储存、调节及释放^[48]。神经元之间的交流是由

突触小泡释放的神经递质介导的。研究表明,突触小泡蛋白表达增加能够增强大鼠的空间辨别性学习记忆能力^[49],在创伤后应激障碍的大鼠模型中,突触小泡蛋白的表达较空白组明显减少,创伤后刺激激活脑内的 5-HT 递质系统,神经元损伤甚至是凋亡及坏死,突触前膜突触小泡蛋白的合成及释放也减少,突触可塑性的功能减退,最终导致大鼠的空间记忆能力减退^[48]。

BDNF、Gad1、Slc32a1 (VGAT)、Gabre、Htr1b 同时在伏隔核及结肠中表达的差异基因。BDNF 在哺乳动物大脑中广泛表达,并与发育、神经再生、突触传递、突触可塑性和神经发生有关,BDNF 含量在抑郁患者体内血清中降低^[50-51],且 BDNF 可以介导抗抑郁药的治疗作用^[52]。肠道细菌代谢产物 SCFAs 和次级胆汁酸可促进胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的产生,GLP-1 促进 BDNF 的产生。伏隔核及结肠测序结果显示,与空白组比较,模型组中 BDNF 表达量升高,而毛蕊花糖苷干预后,较模型组相比表达量明显下降,伏隔核组织中 BDNF 的 mRNA 表达量与测序结果相一致。同时大量实验表明,CUMS 诱导抑郁模型会导致伏隔核中 BDNF 表达增加^[53-55]。此结果与抑郁症患者血清及抑郁动物模型中海马体、前额叶中的 BDNF 表达相反。尽管 BDNF 在海马体及前额叶中发挥抗抑郁作用,但在不同脑区可能有相反作用。Gad1、Slc32a1 (VGAT)、Gabre 3 个基因主要富集在 GABA 能突触信号通路。GABA 能中间神经元通过释放 GABA 激活神经元上的 GABAA 受体,使氯离子进入神经元,从而起到抑制作用^[56-57]。大量实验证明,肠道微生物双歧杆菌可产生 GABA^[58-60]。Gad1 和 Slc32a1 (VGAT) 分别在 GABA 的代谢、转运过程中起重要作用。Gabre 是 GABAA 受体亚基。在伏隔核中,Gabre 在毛蕊花糖苷干预后表示下调,但在结肠中毛蕊花糖苷干预后表示上调,伏隔核组织中 Gad1、Slc32a1 (VGAT) mRNA 表达量与测序结果相一致。目前关于 Gabre 在抑郁中的作用机制及不同组织中的作用机制研究较少,Gabre 在伏隔核与结肠中是否为拮抗作用,值得后续更加深入研究,并为以后 Gabre 深入研究提供思路。5-HT 是常见且主要的脑肠肽,脑肠肽作为脑和胃肠道中双重分布的肽类,是脑肠轴的重要因子,具有神经递质和激素双重作用^[61]。5-HT 作为主要的抑制性神经递质,对调节认知、情绪和行为功能等有重要作用^[62],抑郁症患者体内 5-HT 含量减少^[63-65],选择性 5-HT 重摄取抑制剂是临床常用抗

抑郁药物。同时,5-HT在调节胃肠道运动,促进肠神经、黏膜生长,促进肠炎症等方面具有重要作用^[66],肠道微生物代谢产生的SCFAs可调节体内5-HT的水平^[67]。5-HT的合成和分泌也受各种因素影响,包括HPA轴、免疫系统和肠脑的影响,并且5-HT含量改变也会反向影响这些器官^[68-69]。5-HTR1B编码5-HT1B受体,5-HT1B受体是一种神经末梢自身受体,参与调节大鼠大脑皮层中5-HT的合成和释放,5-HT1B受体与抑郁的病理生理学有关^[70]。测序结果表明,毛蕊花糖苷干预后Htr1b表达下调,与NAUTIYAL等^[71]实验结果表明的缺乏Htr1b自身受体会导致焦虑和抑郁相关行为的减少结果一致。

综上所述,毛蕊花糖苷通过神经活性配体-受体相互作用、GABA能突触、突触小泡循环、cAMP等信号通路,增加单胺类神经递质、减少促炎性细胞因子、恢复兴奋性/抑制性神经递质平衡,影响脑-肠交互对话,进而发挥抗抑郁功效。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ZHANG H, XUE X, PAN J, et al. Integrated analysis of the chemical-material basis and molecular mechanisms for the classic herbal formula of Lily Bulb and *Rehmannia* decoction in alleviating depression[J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 107.
- [2] 马柯, 张洪秀, 董振飞, 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.
- [3] SHANG B, ZHANG H, LU Y, et al. Insights from the perspective of traditional Chinese medicine to elucidate association of Lily disease and Yin deficiency and internal heat of depression [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 8899079.
- [4] 赵洪庆, 唐林, 吴碧茹, 等. 百合地黄汤抑制NLRP3炎症小体激活改善焦虑性抑郁症模型大鼠海马神经元损伤[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(20): 7-14.
- [5] 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.
- [6] 褚雪菲, 刘道龙, 周军怀, 等. 四逆散合百合地黄汤加减干预焦虑性失眠的临床观察[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(8): 1295-1297.
- [7] 徐航, 胡绘姐, 张余玲, 等. 百合地黄汤联合帕罗西汀治疗阴虚型广泛性焦虑症30例临床观察[J]. *国医论坛*, 2019, 34(5): 27-28.
- [8] 方欢乐, 韩宁娟, 李晓明, 等. 百合地黄汤抗焦虑作用的研究[J]. *海南医学院学报*, 2019, 25(5): 326-329.
- [9] 张永华, 胡霖霖. 百合地黄汤对创伤后应激障碍大鼠海马5-HT水平的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(12): 2672-2674.
- [10] 胡霖霖, 张永华, 苏玉刚. 百合地黄汤对创伤后应激障碍大鼠行为学及海马GR/MR表达的影响[J]. *中国中医药科技*, 2014, 21(2): 135-137.
- [11] ZHANG H, CHI X, PAN W, et al. Antidepressant mechanism of classical herbal formula lily bulb and *Rehmannia* decoction: Insights from gene expression profile of medial prefrontal cortex of mice with stress-induced depression-like behavior [J]. *Genes Brain Behav*, 2020, 19(5): e12649.
- [12] 潘文超, 潘瑾, 薛晓燕, 等. 百合地黄汤现代方化学成分研究[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(8): 1884-1888.
- [13] 伍银月, 邓燕红, 殷锦锦, 等. 毛蕊花糖苷通过下调CD44表达抑制胶质瘤细胞上皮间质转化和侵袭[J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41(20): 2066-2070, 2081.
- [14] ZHANG Y, YUAN Y, WU H, et al. Effect of verbascoside on apoptosis and metastasis in human oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(4): 980-991.
- [15] DE MOURA SPEROTTO N D, STEFFENS L, VERÍSSIMO R M, et al. Wound healing and anti-inflammatory activities induced by a *Plantago australis* hydroethanolic extract standardized in verbascoside [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 225: 178-188.
- [16] NAM S Y, KIM H M, JEONG H J. Attenuation of IL-32-induced caspase-1 and nuclear factor- κ B activations by acteoside [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 574-582.
- [17] YUAN J, REN J, WANG Y, et al. Acteoside binds to Caspase-3 and exerts neuroprotection in the rotenone rat model of Parkinson's disease [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162696.
- [18] WANG H, XU Y, YAN J, et al. Acteoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against beta-amyloid-induced cell injury [J]. *Brain Res*, 2009, 1283: 139-147.
- [19] GAO W, WANG Y S, QU Z Y, et al. *Orobancha cernua* loefling attenuates ultraviolet b-mediated photoaging in human dermal fibroblasts [J]. *Photochem Photobiol*, 2018, 94(4): 733-743.
- [20] BIASIBETTI E, BRUNI N, BIGLIATI M, et al. Lactoferricin/verbascoside topical emulsion: A possible alternative treatment for atopic dermatitis in

- dogs[J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(17):2107-2110.
- [21] 赵小然. β -谷甾醇和毛蕊花糖苷对肺炎链球菌溶血素的抑制作用及机制[D]. 长春:吉林大学, 2017.
- [22] MAQUIAVELI C, ROCHETTI A L, FUKUMASU H, et al. Antileishmanial activity of verbascoside: Selective arginase inhibition of intracellular amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* with resistance induced by LPS plus IFN- γ [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 127:28-33.
- [23] ZHANG H, CHI X, PAN W, et al. Antidepressant mechanism of classical herbal formula lily bulb and *Rehmannia* decoction: Insights from gene expression profile of medial prefrontal cortex of mice with stress-induced depression-like behavior [J]. *Genes Brain Behav*, 2020, 19(5):e12649.
- [24] 邓海峰, 孙纛利, 王兴红, 等. 毛蕊花糖苷对 CUMS 大鼠学习记忆能力及突触可塑性的影响[J]. *现代预防医学*, 2019, 46(23):4340-4344.
- [25] 邓海峰, 孙纛利, 陈浩, 等. 毛蕊花糖苷对抑郁症大鼠行为学和前额叶皮层内质网应激的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(1):101-106.
- [26] ZHANG H, CHI X, PAN W, et al. Antidepressant mechanism of classical herbal formula *Lily bulb* and *Rehmannia* decoction: Insights from gene expression profile of medial prefrontal cortex of mice with stress-induced depression-like behavior [J]. *Genes Brain Behav*, 2020, 19(5):e12649.
- [27] EDEM E E, ANYANWU C C, NEBO K E, et al. Ketamine abrogates sensorimotor deficits and cytokine dysregulation in a chronic unpredictable mild stress model of depression[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2022, 239(1):185-200.
- [28] LIANG S, WU X, HU X, et al. Recognizing depression from the Microbiota-Gut brain axis[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6):1-16.
- [29] 陶静, 周铭, 王玉婷, 等. 杨梅素抗抑郁作用及对神经递质的调控机制[J]. *中成药*, 2021, 43(11):3195-3198.
- [30] PASCO J A, NICHOLSON G C, WILLIAMS L J, et al. Association of high-sensitivity C-reactive protein with de novo major depression [J]. *Br J Psychiatry*, 2010, 197(5):372-377.
- [31] 任非非. 基于 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路研究醒脾解郁方对抑郁大鼠海马神经元突触重塑的影响[D]. 北京:北京中医药大学, 2021.
- [32] 丁凤敏, 吴佳佳, 邹小娟, 等. 逍遥散对抑郁模型大鼠下丘脑、结肠中 P 物质和血管活性肠肽的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(7):3350-3352.
- [33] LIU L, ZOU Z, YANG J, et al. Jianpi Jiyeu decoction, an empirical herbal formula, exerts psychotropic effects in association with modulation of gut microbial diversity and GABA activity [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:645638.
- [34] GAMBARO E, GRAMAGLIA C, BALDON G, et al. "Gut-brain axis": Review of the role of the probiotics in anxiety and depressive disorders[J]. *Brain Behav*, 2020, 10(10):e01803.
- [35] MLYNARSKA E, GADZINOWSKA J, TOKAREK J, et al. The role of the microbiome-brain-Gut Axis in the pathogenesis of depressive disorder [J]. *Nutrients*, 2022, 14(9).
- [36] 何屹, 余刚, 郑鹏, 等. 肠脑轴与帕金森病发病机制研究进展[J]. *中国全科医学*, 2018, 21(9):1020-1023.
- [37] ZHU Z, WANG G, MA K, et al. GABAergic neurons in nucleus accumbens are correlated to resilience and vulnerability to chronic stress for major depression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22):35933-35945.
- [38] 司亚伟. 慢性应激诱导抑郁样和抑郁抵抗小鼠在伏隔核中 mRNA 和 miRNA 表达谱的变化[D]. 青岛:青岛大学, 2018.
- [39] FRANCIS T C, LOBO M K. Emerging role for nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes in depression[J]. *Biol Psychiatry*, 2017, 81(8):645-653.
- [40] BYRNE C S, CHAMBERS E S, ALHABEED H, et al. Increased colonic propionate reduces anticipatory reward responses in the human striatum to high-energy foods[J]. *Am J Clin Nutr*, 2016, 104(1):5-14.
- [41] NETTLETON J E, KLANCIC T, SCHICK A, et al. Low-dose stevia (rebaudioside a) consumption perturbs gut microbiota and the mesolimbic dopamine reward system[J]. *Nutrients*, 2019, 11(6):1248.
- [42] AGUSTÍ A, CAMPILLO I, BALZANO T, et al. *Bacteroides uniformis* CECT 7771 modulates the brain reward response to reduce binge eating and anxiety-like behavior in rat[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(10):4959-4979.
- [43] WEI J, LIU J, LIANG S, et al. Low-dose exposure of silica nanoparticles induces neurotoxicity via neuroactive ligand-receptor interaction signaling pathway in zebrafish embryos[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15:4407-4415.
- [44] 王瑾, 罗艳敏, 黎悦, 等. 大脑 GABA 能中间神经元在抑郁症发病及抗抑郁治疗中的作用[J]. *中国体视学与图像分析*, 2020, 25(1):31-44.
- [45] 徐航, 陈焕新, 王玮文. GABA 能系统在应激诱发的抑郁症中的作用[J]. *心理科学进展*, 2017, 25(12):

- 2075-2081.
- [46] 李德顺,袁丽,刘奇,等.百合知母汤对抑郁症大鼠环磷酸腺苷信号通路的影响[J].武汉大学学报:医学版,2015,36(6):867-871.
- [47] 王金梦,杨玉,刘星玥,等.基于信号通路的中药抗抑郁症作用机制研究进展[J].中华中医药学刊,2021,39(1):115-118.
- [48] 林玲,高丽,师瑞红.PTSD大鼠海马CA1区和前额叶皮层突触小泡蛋白的表达[J].中国病理生理杂志,2019,35(2):374-378.
- [49] YAO Y, WANG F, YANG X, et al. Bombesin attenuated ischemia-induced spatial cognitive and synaptic plasticity impairment associated with oxidative damage [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103:87-93.
- [50] 黄凯旋,米健国,李文忠.越鞠保和丸联合温针灸治疗抑郁症临床观察[J].山西中医,2021,37(11):18-21.
- [51] 李吉军,陈丰博,张冬梅.盐酸帕罗西汀片治疗抑郁发作情绪障碍对P物质、神经肽Y、5-羟色胺及去甲肾上腺素水平的影响分析[J].当代医学,2021,27(33):28-30.
- [52] MARTINOWICH K, MANJI H, LU B. New insights into BDNF function in depression and anxiety[J]. Nat Neurosci, 2007, 10(9):1089-1093.
- [53] YU H, CHEN Z Y. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry[J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(1):3-11.
- [54] 陈珍珍. D-丝氨酸通过抑制伏隔核区 BDNF 信号通路和调节突触适应产生抗抑郁作用[D]. 南昌:南昌大学,2021.
- [55] FRANCIS T C, LOBO M K. Emerging role for nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes in depression[J]. Biol Psychiatry, 2017, 81(8):645-653.
- [56] GUPTA A, WANG Y, MARKRAM H. Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex[J]. Science, 2000, 287(5451):273-278.
- [57] GASSMANN M, BETTLER B. Regulation of neuronal GABA (B) receptor functions by subunit composition [J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13 (6) : 380-394.
- [58] DURANTI S, RUIZ L, LUGLI G A, et al. *Bifidobacterium adolescentis* as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):14112.
- [59] BARRETT E, ROSS R P, O'TOOLE P W, et al. gamma-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine [J]. J Appl Microbiol, 2012, 113(2):411-417.
- [60] POKUSAEVA K, JOHNSON C, LUK B, et al. GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine [J]. Neurogastroenterol Motil, 2017, 29(1):1-14.
- [61] 刘倩,毛心勇,张涛,等.肠易激综合征的中医药多维度治疗机制[J].辽宁中医杂志,2021,48(11):206-210.
- [62] BACQUÉ -CAZENAVE J, BHARATIYA R, BARRIÈRE G, et al. Serotonin in animal cognition and behavior[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5):1649.
- [63] 赵涵,程一升,张辉.醒脑解郁汤治疗卒中后抑郁的疗效及对血清NE、5-HT水平影响[J].中华中医药学刊,2021,39(11):202-205.
- [64] 韩艳平.滋水清肝饮对围绝经期抑郁症患者的临床疗效及对血清孤啡肽和5-羟色胺的影响[J].中医临床研究,2020,12(12):35-36.
- [65] 王玲,郑蔓茵.无抽搐电休克对抑郁症患者认知功能及血清BDNF、5-HT水平的影响[J].现代医学与健康研究电子杂志,2020,4(2):29-30.
- [66] GERSHON M D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract [J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2013, 20(1):14-21.
- [67] 刘兰香,王海洋,谢鹏.肠道微生物紊乱诱导抑郁的肠-脑分子机制研究[J].重庆医科大学学报,2021,46(9):1003-1007.
- [68] MAES M, LEONARD B E, MYINT A M, et al. The new '5-HT' hypothesis of depression: Cell-mediated immune activation induces indoleamine 2, 3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2011, 35(3):702-721.
- [69] O'MAHONY S M, CLARKE G, BORRE Y E, et al. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis[J]. Behav Brain Res, 2015, 277:32-48.
- [70] YANG P, YANG M, LI P, et al. A Meta-analysis of 5-hydroxytryptamine receptor 1B polymorphisms with risk of major depressive disorder and suicidal behavior [J]. Front Psychiatry, 2021, 12:696655.
- [71] NAUTIYAL K M, TRITSCHLER L, AHMARI S E, et al. A lack of serotonin 1B autoreceptors results in decreased anxiety and depression-related behaviors[J]. Neuropsychopharmacology, 2016, 41(12):2941-2950.

[责任编辑 顾雪竹]