

## 加味四逆散对抑郁模型大鼠肝损伤的保护作用

陈新, 牟雄军, 刘昊, 刘焱文, 刘松林\*

(湖北中医药大学, 中药资源与中药化学湖北省重点实验室, 武汉 430065)

**[摘要]** 目的: 研究加味四逆散对慢性温和不可预知性应激(CUMS)结合孤养法制作抑郁模型所致肝损伤的保护作用。方法: 将48只SD雄性大鼠随机分为6组, 正常组, 抑郁模型组, 氟西汀( $1.58 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )组, 和加味四逆散低、中、高剂量( $3.67, 7.34, 14.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )组, 每组8只。造模给药结束后, 采用生化试剂盒法检测各组大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT), 天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平和肝脏组织中炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), 白细胞介素-6(IL-6)水平。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测加味四逆散对肝细胞中半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), 活化型半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)蛋白表达的干预作用。结果: 生化试剂盒检测显示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清中的ALT, AST水平明显升高( $P < 0.05$ ), 肝脏组织中炎症因子TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和IL-6水平明显升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 加味四逆散低、中剂量组可降低血清中ALT, AST和炎症因子TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和IL-6水平( $P < 0.05, P < 0.01$ )。Western blot检测显示, 与正常组比较, 模型组大鼠肝细胞中的Caspase-3蛋白表达下降, cleaved Caspase-3蛋白表达上升( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 加味四逆散低、中剂量组可以上调Caspase-3蛋白的表达, 下调cleaved Caspase-3蛋白的表达( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结论: 慢性应激反应所致抑郁模型可造成肝损伤, 加味四逆散能够通过调节多种生理生化和炎症因子指标的水平, 抑制肝脏细胞凋亡来达到保肝作用。

**[关键词]** 加味四逆散; 抑郁模型; 肝损伤; 肝功能; 炎症因子; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R22; R242; R284. 1; R285. 5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)18-0018-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201822

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200716.1500.002.html>

**[网络出版日期]** 2020-7-16 17:12

### Protective Effect of Modified Sinisan on Depression-induced Liver Injury in Rat

CHEN Xin, MOU Xiong-jun, LIU Hao, LIU Yan-wen, LIU Song-lin\*

(Hubei Provincial Key Laboratory for Resource and Chemistry of Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective effect of modified Sinisan on liver injury caused by chronic unpredictable mild stress (CUMS) combined with solitary nutrition method based on a depression model. **Method:** Forty-eight SD male rats were randomly divided into normal group, depression model group, fluoxetine group ( $1.58 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), and low, medium and high-dose modified Sinisan ( $3.67, 7.34, 14.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) groups, with 8 rats in each group. After the administration of the model, the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) in serum and the levels of inflammatory factors tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , and IL-6 in liver tissues were measured by a biochemical kit method. Western blot was used to detect the expressions of cysteine aspartic acid-specific protease-3 (Caspase-3) and cleaved Caspase-3 in liver cells after intervention with modified Sinisan. **Result:** Compared with the normal group, the biochemical test showed that the levels of ALT and AST in the serum of the model group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the levels of inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in

**[收稿日期]** 20200103(012)

**[基金项目]** 湖北省教育厅科学技术研究项目(Q20182009)

**[第一作者]** 陈新, 副研究员, 从事中药药效物质基础研究, E-mail: chenxin30172@hotmail.com

**[通信作者]** \* 刘松林, 教授, 从事经方防治消化及心血管疾病的临床基础研究, E-mail: newforest@163.com

liver tissue significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, low, medium-dose modified Sinisan groups significantly reduced serum ALT, AST and inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 levels ( $P<0.05$ ). Western blot showed that compared with the normal group, the protein expression of Caspase-3 in model rat liver cells decreased, while the protein expression of cleaved Caspase-3 increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the model group, low, medium-dose modified Sinisan groups could up-regulate Caspase-3 protein expression, and down-regulated the expression of cleaved Caspase-3 protein ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Chronic stress-induced depression model can cause liver damage. Modified Sinisan can have the hepatoprotective effect by regulating the levels of various physiological, biochemical and inflammatory factor indicators, and inhibiting liver cell apoptosis.

**[Key words]** modified Sinisan; depressive model; liver injury; liver function; inflammatory factor; cell apoptosis

肝脏是高等动物体内以代谢功能为主的一个器官,参与营养代谢以及药物和异生物质的解毒等作用。抑郁症是一种全球范围内普遍存在的情感障碍性精神疾病,其临床表现主要包括心情抑郁,失去各种兴趣和快乐感的精神特征,并常伴有睡眠异常,食欲减退,体质量减轻,性欲减退等躯体症状,被世界卫生组织评为最易导致伤残的十大疾病之一<sup>[1-2]</sup>。有关于抑郁症的发病机制,至今尚没有研究出明确的生理、病理学说,但是临床研究上相继提出了神经递质假说,神经可塑性假说,神经内分泌紊乱,免疫功能紊乱和遗传因素影响等假说。此外,近年来的研究发现,抑郁症除了遗传因素之外,慢性应激(如工作压力过大、失业、失恋、亲友亡故等)是导致抑郁症频发的重要原因<sup>[3]</sup>。另一方面,研究发现慢性应激导致的抑郁反应,与多种疾病具有相关性,包括心血管系统疾病、免疫系统疾病、肿瘤疾病以及传染性疾病、艾滋病等,还与肝脏疾病有着密切的关系,可影响肝脏的功能<sup>[4-8]</sup>。加味四逆散来自于国医大师梅国强教授长达数10年的临床实践,以出自《伤寒论》的四逆散为基础方,进行加味拟定的治疗情志失调的经验方,其抗抑郁疗效显著<sup>[9-10]</sup>。查阅文献发现有关于慢性应激所致抑郁症和肝损伤的研究较少,故本实验以慢性温和和不可预见性应激大鼠抑郁模型作为研究对象,重点考察抑郁模型大鼠的肝损伤程度及灌胃加味四逆散后的肝保护作用,拟为抑郁症与肝损伤的相关性研究提供实验基础。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性SD大鼠48只,体质量120~150 g,购自湖北省实验动物研究中心,许可证号SYXK(鄂)2017-0067。饲养于湖北中医药大学实验动物中心,并获得了湖北中医药大学实验动物伦

理委员会批准(批准号20190309)。

**1.2 药物与试剂** 加味四逆散全方所需中药饮片均购自于湖北九州通医药集团,经湖北中医药大学叶晓川研究员鉴定均为正品;盐酸氟西汀胶囊(苏州制药有限公司,批号7686A);BCA蛋白质浓度测定试剂盒,磷酸缓冲盐溶液(PBS),生理盐水,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒,RIPA总蛋白裂解液,苯甲基磺酰氟(PMSF),ECL化学发光检测试剂盒,磷酸化蛋白酶抑制剂,蛋白上样缓冲液,丽春红染液,二抗兔抗(上海Aspen公司,批号分别为AS1086, AS1044, AS1087, AS1012, AS1004, AS1006, AS1059, AS1008, AS1011, AS1022, AS1107);丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),白细胞介素-6(IL-6)测定试剂盒(南京建成科技有限公司,批号分别为C009-2, C0010-2, C018-1, C019-1, C020-1);蛋白酶抑制剂混合液(瑞士罗氏公司,批号04693159001);半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),活化型半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab37168, ab49822, 4970S)。

**1.3 仪器** DR-200Bs型酶标仪(无锡华卫德朗仪器有限公司);TGL-16c型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);TGL-16型冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器);DYY-6C型电泳仪,DY CZ-400D型转移电泳仪槽,DY CZ-24DN型垂直电泳槽,WD-9405A型脱色摇床(北京六一仪器厂);AX-II型暗匣(广东粤华医疗器械厂有限公司);LiDE110型扫描仪(日本佳能公司)。

## 2 方法

**2.1 分组** 雄性SD大鼠48只,随机均分为正常

组、模型组、氟西汀组和加味四逆散低、中、高剂量组,每组8只。

**2.2 造模** 参照文献[11],除正常组外,其余组别大鼠均采用慢性温和不可预知性应激(CUMS)结合单笼喂养进行抑郁模型制作,造模期间大鼠接受不同的应激刺激,包括断水24 h,断食24 h,4℃冰水游泳5 min,夹尾1 min,电击足底(电压50 mV,每5 s刺激1次,间歇5 s,共刺激10次),昼夜颠倒,摇晃(1次/s,持续5 min)。每天随机选择1种刺激,且两两不重复,造模时间共计3周,期间正常组自由摄食,造模成功率可高达80%。造模完成后,采用糖水消耗实验、旷场实验、强迫游泳实验对抑郁模型进行评价,随后根据行为学结果将造模成功的大鼠随机分为模型组、氟西汀组、加味四逆散低、中、高剂量组。

**2.3 药物制备** 加味四逆散由北柴胡10 g,白芍10 g,炒枳实10 g,炙甘草6 g,郁金10 g,广木香10 g,砂仁10 g,焦白术15 g,黄连6 g,吴茱萸6 g组成;按处方中的比例准确称取药材,加水煎煮3次,加水量分别为10,8,8倍量,每次煎煮时间为2 h,将3次所得的水煎液合并,浓缩,得生药质量分数为21.58 g·kg<sup>-1</sup>冻干粉,置于干燥器中保存。

**2.4 药物用法与用量** 参照《药理学实验方法》<sup>[12]</sup>,根据成人临床等效剂量换算,氟西汀组按1.58 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>给药;加味四逆散低、中、高剂量组按3.67,7.34,14.68 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>给药;正常组灌胃相应的纯水。于造模3周后对3组中药干预组灌胃不同剂量(所配制的药液质量浓度分别为0.083,0.166,0.332 g·mL<sup>-1</sup>,并根据大鼠的实际体质量来换算出具体的给药体积)的药物,连续7 d。

**2.5 行为学实验** 行为学考察包括糖水消耗,强迫游泳和旷场实验,具体实验方法参考前期的实验数据<sup>[9-10]</sup>。

**2.6 相关生理生化指标的测定** 将大鼠麻醉后静脉取血,并于4℃,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清即得血清。根据试剂盒说明书测定测肝脏(或血清)各生化指标。

**2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白的表达** 将肝组织用预冷的PBS缓冲液漂洗2~3次,去除血污,剪成小块置于匀浆器中。加入10倍于组织体积的组织蛋白提取试剂,冰浴彻底匀浆。将匀浆液转移至离心管中,振荡。冰浴30 min,期间用移液器反复吹打,确保匀浆液完全裂解。4℃,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,收集上清,收集蛋白,BCA

法测定蛋白浓度。分别加入Caspase-3,cleaved Caspase-3,GAPDH一抗溶液(1:1 000)4℃下摇床孵育过夜,TBST漂洗3次,每次5 min,再加入二抗稀释液稀释好的二抗溶液(1:1万)孵育0.5 h,用TBST在室温下摇床上洗4次,每次5 min。最后使用ECL试剂盒进行显影检测,以GAPDH为内参。

**2.8 统计学方法** 采用SPSS 19.0统计软件进行统计分析,Craphpad prism 5软件进行作图。扫描胶片,并用AlphaEaseFC软件分析对蛋白条带相对于内参GAPDH的灰度比值进行分析(所有蛋白条带均扣除背景)。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠行为学的影响** 抑郁模型大鼠的糖水消耗率、旷场运动总距离、旷场穿越中央次数显著下降;旷场静止时间和强迫游泳不动时间显著上升;灌胃给药加味四逆散后,其行为学结果发现糖水消耗率、旷场运动总距离、旷场穿越中央次数显著上升;旷场静止时间和强迫游泳不动时间下降<sup>[9-10]</sup>。

**3.2 对大鼠血清中ALT和AST水平的影响** 与正常组比较,模型组中ALT,AST水平明显升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,氟西汀组、加味四逆散低、中剂量组ALT,AST水平均明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),加味四逆散低剂量组比中剂量组降低显著( $P<0.01$ )。表明加味四逆散可以有效地下调抑郁模型大鼠血清中ALT,AST水平。见表1。

**3.3 对大鼠肝组织中炎症因子水平的影响** 与正常组比较,模型组TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,IL-6水平明显升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,氟西汀组、加味四逆散低、中剂量组中TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,IL-6水平均明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),其中加味四逆散低剂量组比中剂量组降低显著( $P<0.01$ )。表明加味四逆散可以有效地下调抑郁模型大鼠肝脏组织中TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,IL-6水平。见表2。

**3.4 对大鼠相关蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组Caspase-3蛋白表达明显降低,cleaved Caspase-3蛋白表达明显升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,氟西汀组、加味四逆散低、中剂量组中Caspase-3蛋白表达明显升高,cleaved Caspase-3蛋白表达明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。推测加味四逆散的护肝作用可能与调控细胞凋亡及其相关信号有关。见表3,图1。

表1 加味四逆散对ALT,AST,AST/ALT水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 1 Effect of modified Sinisan on ALT,AST,AST/ALT levels( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>	AST/ALT
正常	-	95.27±0.22	250.20±0.49	2.63±0.41
模型	-	229.50±1.07 <sup>1)</sup>	511.77±1.01 <sup>1)</sup>	2.23±0.24 <sup>1)</sup>
氟西汀	0.001 58	140.66±0.83 <sup>2)</sup>	311.91±0.68 <sup>2)</sup>	2.22±1.12
加味四逆散	3.67	134.18±0.51 <sup>3)</sup>	254.89±2.07 <sup>3)</sup>	1.90±0.31 <sup>3)</sup>
	7.34	157.01±0.69 <sup>3,4)</sup>	367.86±0.89 <sup>3,4)</sup>	2.34±2.08 <sup>2)</sup>
	14.68	197.52±2.01	405.24±1.52	2.05±3.05 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01;与加味四逆散低剂量组比较<sup>4)</sup>P<0.01(表2,3同)。

表2 加味四逆散对TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ 和IL-6水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

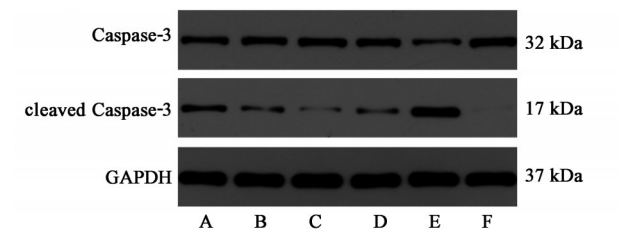
Table 2 Effect of modified Sinisan on TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$  and IL-6 levels( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
正常	-	35.27±1.25	12.09±0.66	74.21±1.01
模型	-	109.25±2.10 <sup>1)</sup>	50.72±2.14 <sup>1)</sup>	223.15±0.42 <sup>1)</sup>
氟西汀	0.001 58	40.76±0.83 <sup>2)</sup>	21.14±0.86 <sup>2)</sup>	80.65±1.21 <sup>2)</sup>
加味四逆散	3.67	34.81±1.03 <sup>3)</sup>	15.21±0.33 <sup>3)</sup>	84.32±0.31 <sup>3)</sup>
	7.34	57.22±2.14 <sup>2,4)</sup>	36.18±0.49 <sup>2,4)</sup>	99.67±1.98 <sup>2,4)</sup>
	14.68	64.35±1.06	42.71±2.52 <sup>2)</sup>	139.44±2.05 <sup>2)</sup>

表3 加味四逆散对Caspase-3,cleaved Caspase-3蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of modified Sinisan on Caspase-3, cleaved Caspase-3 protein expression( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Caspase-3 /GAPDH	cleaved Caspase-3 /GAPDH
正常	-	0.60±0.07	0.07±0.04
模型	-	0.17±0.05 <sup>1)</sup>	0.59±0.09 <sup>1)</sup>
氟西汀	0.001 58	0.32±0.07 <sup>2)</sup>	0.25±0.07 <sup>2)</sup>
加味四逆散	3.67	0.46±0.07 <sup>3)</sup>	0.11±0.05 <sup>3)</sup>
	7.34	0.36±0.06 <sup>2)</sup>	0.19±0.05 <sup>2)</sup>
	14.68	0.25±0.08	0.35±0.03



A~C.加味四逆散高、中、低剂量组;D.氟西汀组;E.模型组;F.正常组  
图1 加味四逆散作用抑郁模型大鼠肝组织中Caspase-3,cleaved Caspase-3蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of modified Sinisan on Caspase-3, cleaved Caspase-3 protein expression levels

#### 4 讨论

中医理论认为,肝藏血,主疏泄,具有储存血

液,疏泄情志等功能,其中疏泄气机的部分尤为重要。当气机疏泄正常时,可推动血液在体内循行,濡养全身脏腑,并在血液濡养的作用下,使肝气不会亢逆,达到情志调畅和体内水液精津正常疏布的目的<sup>[13]</sup>。因此,中医专家认为长期的情志不疏易造成肝脏的藏血及疏泄功能失常,使得健康状况越来越差,最终可导致抑郁、失眠、便秘、三高等慢性疾病频发。另一方面,当个体在察觉或面临到自身环境变化时,恐对机体造成威胁或挑战,需做出适应和应对的过程称之为应激反应,是人类生活中普遍存在的一种现象<sup>[14]</sup>。当应激反应过度或者持续时间过长时,一定程度上会影响肝脏的疏泄功能,导致人体气机的升降出入失常,造成机体出现功能性或器质性损伤。研究还发现现有疾病约有70%~90%都与心理应激有关,其中尤以抑郁症为重<sup>[15]</sup>。因此,肝损伤与抑郁症之间的主要作用途径是应激反应,进而通过神经、内分泌和免疫系统相互作用,影响整个机体的协调性<sup>[16]</sup>。

ALT,AST是临床上常用来反映肝功能的具有代表性的检测指标。研究发现,ALT主要存在肝细胞浆中,如果1%的肝细胞出现坏死,ALT水平就可增高1倍。因此,ALT被世界卫生组织认为是最能直观反映肝功能损伤的检测指标之一。而AST主要存在于肝细胞的线粒体内,当肝脏发生严重损坏

或坏死时,AST水平同样也会显著升高,并且AST升高程度与肝细胞受损程度相一致<sup>[17]</sup>。本研究中,模型组大鼠血清中ALT,AST水平显著升高,表明CUMS诱导的抑郁模型能损害大鼠的肝脏功能。灌胃加味四逆散后,ALT,AST水平下降,肝功能逐渐得到修复,表明加味四逆散在治疗抑郁的同时,对其肝损伤也在进行修复。

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6是来自于体内免疫细胞分泌的炎症因子,在炎症过程中可起到关键作用。这些炎症因子通过诱导平滑肌细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞,产生粒细胞巨嗜细胞集落刺激因子,进而对介导炎症反应、免疫调节、脂质代谢甚至抗肿瘤都产生影响,其发挥作用的重要靶器官位于肝脏<sup>[18]</sup>。此外,国内外有关于抑郁症的研究表明,炎症因子如IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ 等在抑郁症的发生发展中同样起到重要作用,其中IL-6, TNF- $\alpha$ 与抑郁症量表评分表现出正相关性<sup>[19-20]</sup>。本研究中,模型组大鼠肝组织中, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和IL-6水平均有明显提高,表明在抑郁模型大鼠肝脏中有明显的炎症反应进行。灌胃加味四逆散后,可有效缓解慢性应激诱导的肝脏炎症反应。并且在低剂量组中,肝脏中各炎症因子的含量均接近正常水平,说明加味四逆散的疗效和剂量不存在依赖性。

细胞凋亡是指细胞在一定的生理或病理条件下,受内在多种基因(如Caspase家族,癌基因等)的严格控制,完成一系列基因的激活、表达以及调控等过程。3个重要的凋亡通路包括线粒体通路、死亡受体通路和内质网通路。Caspase家族又称半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶,能够通过线粒体通路、死亡受体通路调节细胞凋亡,其中的Caspase-3作为核心成员,是调节细胞凋亡的关键蛋白酶,因此被称为“死亡蛋白酶”,是目前已知的可引起凋亡的最后执行因子,特别是在癌症、缺血性损伤等许多疾病的发生发展中起到重要作用<sup>[21]</sup>。研究还发现B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax)及与死亡因子(Fas)等信号通路与Caspase-3可能存在相互作用<sup>[22]</sup>。cleaved Caspase-3来自于Caspase-3活化过程中经剪切产生的活性片段,其表达程度可反映Caspase-3的活性和细胞凋亡情况,与Caspase-3呈负相关性。本研究中,模型组大鼠肝组织中,cleaved Caspase-3蛋白表达明显高于正常组,提示慢性应激可诱导Caspase-3及cleaved Caspase-3蛋白的表达从而促进肝细胞的凋亡,导致肝损伤。灌胃给药后,加味四逆散可以通过促进Caspase-3蛋白

的表达,抑制cleaved Caspase-3蛋白的表达来达到改善肝损伤的目的。由此推测慢性应激引起的肝细胞凋亡是这些信号通路的共同结果,可对其具体的调节途径进行进一步的研究。

另外,本实验结果发现加味四逆散能够降低抑郁模型大鼠血清中ALT和AST水平,以及大鼠肝组织中TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和IL-6生成,上调Caspase-3蛋白表达,下调cleaved Caspase-3蛋白表达等作用,但与加味四逆散的用剂量存在负相关性,可能与部分药材具有药效与药毒的双重性有关,因为中药的化学成分与药理活性较复杂,往往既可以治疗肝病,也可因为剂量的原因引起肝损伤,从而产生不良反应<sup>[23]</sup>。因此,本实验的研究结果表明抑郁与肝损伤存在着直接相关性,后期可通过探讨慢性应激所致肝损伤的发病机制来推测其导致抑郁的程度和相关治疗措施。

#### [参考文献]

- [1] ZHOU M, WANG H, ZENG X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990—2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2019, 394(10204): 1145-1158.
- [2] FRANKISH H, BOYCE N, HORTON R. Mental health for all: a global goal[J]. *Lancet*, 2018, 392(10157): 1493-1494.
- [3] 王世镛, 李良, 郭萍, 等. 抑郁症家族史及心理应激对首发抑郁症急性期疗效的影响[J]. *中国慢性病预防与控制*, 2017, 25(9): 702-705.
- [4] JAWAD A Z, OLE G, MICHAEL T M, et al. Prevention of depression in patients with cancer: a systematic review and Meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *J Psychiatr Res*, 2020, 120(1): 113-123.
- [5] GRIFFIN A T, FLORIN V, SIDNEY Z, et al. Clinical correlates of depression chronicity among people living with HIV: what is the role of suicidal ideation? [J]. *J Affective Disord*, 2019, 258(1): 163-171.
- [6] KAI G K, BRITTA S, HELGE F. Link between depression and cardiovascular diseases due to epigenomics and proteomics: focus on energy metabolism [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2019, 89(1): 146-157.
- [7] QIN X, WU Z, DONG J, et al. Liver soluble epoxide hydrolase regulates behavioral and cellular effects of chronic stress [J]. *Cell Rep*, 2019, 29(10): 3223-

- 3234,3236.
- [ 8 ] JENNIFER R R, MARIYA T, GEORGIA E H. Deciphering sex differences in the immune system and depression[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2018, 50(1): 67-90.
- [ 9 ] 牟雄军, 刘昊, 李宁, 等. 疏肝和胃汤及其有效物质部位对抑郁模型大鼠下丘脑内多种神经递质含量的影响[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(15): 3343-3348.
- [10] 牟雄军, 明浩, 许乐思, 等. 疏肝和胃汤抗抑郁作用有效物质部位筛选及其对海马内多种神经递质含量影响的研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(3): 526-534.
- [11] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology*, 1987, 93(3): 358-364.
- [12] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1439-1442.
- [13] 李君玲. 基于慢性不可预知温和应激大鼠模型的“肝主疏泄”生物学基础研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [14] SHIELDS G S. Stress and cognition: a user's guide to designing and interpreting studies [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, 112 (104475) : 1-13.
- [15] TSUKAMOTO K, MACHIDA K. Effects of psychological stress on neutrophil phagocytosis and bactericidal activity in humans-a Meta-analysis[J]. *Int J Psychophysiol*, 2014, 91(2): 67-72.
- [16] LUCIA G, STEFANO G, RANKA V, et al. Impact of psychosocial status on liver transplant process[J]. *Ann Hepatol*, 2019, 18(6): 804-809.
- [17] 刘晨, 汤冬静. 血脂血清学指标与肝功能检验应用于脂肪肝诊断中的效果分析[J]. *中国医药指南*, 2019, 17(19): 111-112.
- [18] MAHMOUD M, PAUL M, ANDRES F C. Hepatic complications of inflammatory bowel disease[J]. *Clin Liver Dis*, 2019, 23(2): 191-208.
- [19] SIMPSON W, STEINER M, COOTE M, et al. Relationship between inflammatory biomarkers and depressive symptoms during late pregnancy and the early postpartum period: a longitudinal study[J]. *Rev Bras Psiquiatr*, 2016, 38(3): 190-196.
- [20] SHELTON M M, SCHMINKEY D L, GROER M W. Relationships among prenatal depression, plasma cortisol, and inflammatory cytokines [J]. *Biol Res Nurs*, 2015, 17(3): 295-302.
- [21] LIU J, WANG F, YIN D, et al. Caspase 3 may participate in the anti-tumor immunity of dendritic cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(2): 447-453.
- [22] OPDENBOSCH N V, LAMKANFI M. Caspases in cell death, inflammation, and disease[J]. *Immunity*, 2019, 50(6): 1352-1364.
- [23] 柳小远, 盛梅笑. 治疗慢性肾脏病常用中草药相关肝损伤研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(9): 4210-4213.

[责任编辑 张丰丰]