

基于肝脏 TMT 标记定量蛋白质组学技术研究越鞠丸 防治“双心疾病”的作用机制

张瀚文¹, 于嘉祥¹, 石岩¹, 张文顺¹, 韩雪莹², 张欢¹, 曲超¹,
申鑫惠¹, 马贤德¹, 于睿^{1*}, 于游^{3*}

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600;
3. 辽宁中医药大学附属第二医院, 沈阳 110034)

[摘要] 目的:观察越鞠丸治疗“双心疾病”的效果,并研究其中的作用机制。方法:选用6周龄健康雄性 SPF 级载脂蛋白 E 敲除(AopE^{-/-})小鼠 30 只、同源 C57BL/6J 小鼠 10 只进行实验。将 30 只 AopE^{-/-}小鼠分为模型组、越鞠丸低剂量组(7.58 g·kg⁻¹·d⁻¹)、越鞠丸高剂量组(30.32 g·kg⁻¹·d⁻¹),每组 10 只;C57BL/6J 小鼠 10 只作为空白组,各组灌胃 12 周。饲养期间通过慢性不可预知应激刺激(CUMS)联合高脂饲料诱导的方法构建“双心疾病”模型。灌胃给药后,通过各组小鼠行为学实验结果[旷场实验(OFT)、糖水偏嗜实验(SPT)]、全自动生化分析仪检测小鼠血清天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)的含量及小鼠主动脉、肝脏油红 O、苏木素-伊红(HE)染色,心肌组织 Masson 染色进行模型评价。最后通过肝脏 TMT 标记定量蛋白质组学技术研究其中的作用机制。结果:模型小鼠出现明显的抑郁、焦虑、兴趣丧失、绝望等表现,主动脉、肝脏病理观察也出现明显脂质沉积,心肌组织出现明显心肌纤维化增多的表现,越鞠丸灌胃给药后能改善“双心疾病”模型小鼠的上述症状与指标。与空白组比较,第 12 周模型组小鼠站立次数、中心区域累计时间、总移动距离、移动速度、糖水偏嗜率均显著下降($P<0.01$),与模型组比较,越鞠丸低、高剂量组小鼠上述指标均显著降低($P<0.01$)。取材后,与空白组比较,模型组 AST、ALT、TG 水平显著增多($P<0.01$),5-HT、NE、HDL-C 水平均显著下降($P<0.01$)。肝脏 TMT 标记定量蛋白质组学结果提示“双心疾病”模型小鼠主要引起 ApoE、UDP 葡萄糖基转移酶家族 1 成员 A5(UGT1A5)、FASN 等蛋白表达水平的变化,涉及乙酰辅酶 A 代谢、对细菌的反应、细胞氨基酸分解代谢等过程,与肝脏代谢功能异常有关。越鞠丸防治“双心疾病”涉及了高迁移率核小体结合域 2(HMG2)、CALD1、Mup7 等蛋白表达水平的变化,并对“双心疾病”发病有关的生物过程和异常的通路起到纠正作用,主要有肌肉收缩、紧密连接通路、心肌收缩通路、黏着斑通路等。结论:CUMS 联合高脂饲料诱导 AopE^{-/-}小鼠构建“双心疾病”模型方法合理;越鞠丸可以纠正“双心疾病”模型小鼠抑郁、焦虑状态,同时能减轻其主动脉斑块并纠正异常的血脂、肝功水平;可纠正“双心疾病”模型小鼠的异常生物过程与通路;实验筛选的差异蛋白及所涉及的生理病理变化是下一步研究的重点。

[关键词] 越鞠丸;双心疾病;防治;肝脏;TMT 标记定量蛋白质组学

[中图分类号] R259;R256.2;R395;R714.252 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)01-0026-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230191 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220704.0943.003.html>

[网络出版日期] 2022-07-05 9:01

Mechanism of Yuejuwan in Prevention and Treatment of Psychological and Heart Diseases Based on Liver TMT Labeled Quantitative Proteomics

ZHANG Hanwen¹, YU Jiexiang¹, SHI Yan¹, ZHANG Wenshun¹, HAN Xueying²,
ZHANG Huan¹, QU Chao¹, SHEN Xinhui¹, MA Xiande¹, YU Rui^{1*}, YU You^{3*}

[收稿日期] 2022-04-29

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2013CB532004);辽宁省“兴辽英才计划”青年拔尖人才项目(XLYC2007121);中国博士后科学基金面上资助项目(2021M693853,2021M693852);辽宁省科技厅博士科研启动课题(2021-BS-183);中医脏象理论及应用教育部重点实验室 2021 年度开放基金项目(zyzx2109);国家中医药管理局中药古籍文献和特色技术传承专项(GZY-KJS-2020-026)

[第一作者] 张瀚文,博士,在站博士后,讲师,从事中医药防治代谢系统疾病与心血管疾病,Tel:024-31207086,E-mail:910928463@qq.com

[通信作者] * 于睿,博士,博士生导师,教授,主任医师,从事中西医结合治疗心血管疾病,Tel:024-31207288,E-mail:yurui1969@163.com;

* 于游,博士,副主任医师,从事中西医结合防治心血管疾病方向,Tel:024-31207302,E-mail:yuyou_inzy@163.com

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;
2. College of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China; 3. Second Affiliated Second
Affiliated Hospital in Liaoning University of TCM, Shenyang 110034, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Yuejuwan in the treatment of psychological and heart diseases (PHD) and explore its mechanism. **Method:** Thirty 6-week-old healthy male SPF AopE^{-/-} mice and 10 homologous C57BL/6J mice were selected for the experiment. The 30 AopE^{-/-} mice were divided into a model group, low-dose (7.58 g·kg⁻¹·d⁻¹) and high-dose (30.32 g·kg⁻¹·d⁻¹) Yuejuwan groups, with 10 mice in each group, and 10 C57BL/6J mice were assigned to the blank control group. Intragastrical administration lasted 12 weeks. During feeding, the PHD model was induced by chronic unpredictable mild stress (CUMS) combined with high-fat diet in mice. After intragastric administration, the behavioral results [open field test (OFT) and sucrose preference test (SPT)] of mice in each group, the content of aspartic transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), 5-hydroxytryptamine (5-HT), noradrenaline (NE), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), total cholesterol (TC), and triglyceride (TG) in serum of mice detected by the automatic biochemical analyzer, the oil red O staining and HE staining of aorta and liver and Masson staining of myocardial tissues were used for model evaluation. Finally, liver TMT-labeled quantitative proteomics was used to explore the mechanism of action. **Result:** The model mice showed obvious manifestations of depression, anxiety, loss of interest, and despair, manifest lipid deposition in the aorta and liver by pathological observation, and increased myocardial fibrosis in myocardial tissues. After intragastric administration of Yuejuwan, the above symptoms and indexes of the PHD model mice were improved. Compared with the blank control group, the model group showed decreased standing times, cumulative time in the central area, total moving distance, moving speed, and sucrose preference at week 12 ($P<0.01$). Compared with the model group, the Yuejuwan groups showed decreased indexes mentioned above ($P<0.01$). After sample collection, AST, ALT, and TG levels in the model group were higher ($P<0.01$) and the levels of 5-HT, NE, and HDL-C were lower than those in the blank control group ($P<0.01$). The results of liver TMT labeled quantitative proteomics suggested that the PHD model mainly caused the changes in protein expression levels such as ApoE, UGT1A5, and FASN in mice, involving acetyl CoA metabolism, response to bacteria, cellular amino acid catabolism, and other processes, which were related to the abnormal metabolic function of the liver. The efficacy of Yuejuwan against PHD was achieved mainly through the regulation of high mobility group nucleosomal-binding domain 2 (HMGN2), CALD1, and Mup7 protein expression levels and correcting the biological processes and abnormal pathways related to the pathogenesis of PHD, including muscle contraction, tight junction pathway, myocardial contraction pathway, and focal adhesion pathway. **Conclusion:** CUMS combined with high-fat diet is reasonable in the induction of the PHD model in AopE^{-/-} mice. Yuejuwan can correct the depression and anxiety conditions of PHD model mice, reduce the aortic plaque, and recover the abnormal blood lipid and liver function levels. Furthermore, Yuejuwan can correct abnormal biological processes and pathways of PHD model mice. The differential proteins screened throughout the experiment and the involved physiological and pathological changes are the focus of the next experiment.

[Keywords] Yuejuwan; psychological and heart diseases; prevention and treatment; liver; TMT labeled quantitative proteomics

随着生物-心理-社会医学模式的确立,心理因素在心血管疾病(CVD)的发生发展中的重要作用逐渐被揭示清楚。1995年胡大一教授首先提出“双心疾病”的概念,认为患者除了心脏器质性病变,

心理健康也不可忽视。相关研究显示抑郁症(MDD)、社会孤立和情绪异常这3大心理社会危险因素与CVD的发病密切相关^[1-2]。不健康的焦虑、抑郁状态对CVD的发生、发展及预后有着深远的

影响。有研究表明,抑郁与心血管事件的发生呈正相关,是普通人群的2~3倍^[3-6]。

相对于西医单纯的调脂、抗抑郁治疗,中药多靶点、多途径、较低不良反应等优势受到了广泛的认可。本研究选用的经典名方越鞠丸为理气剂,具有疏肝解郁的功效,主治六郁,临床常用来治疗抑郁、焦虑等情志疾病。相关研究表明,越鞠丸也可以显著降低患者的血脂、炎性因子水平^[7-10]。越鞠丸对MDD、动脉粥样硬化(AS)的缓解具有类似中医“异病同治”的功效,是中医药防治“双心疾病”的优势选择。课题组前期通过生信分析及基因表达汇编(GEO)数据库中AS患者与健康志愿者主动脉样本的测序数据获取了越鞠丸中有效成分及AS疾病靶点,整理与筛选后预测越鞠丸活性成分治疗AS可能的作用靶点,并进行基因本体(GO)注释、京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析,结果发现越鞠丸防治AS主要是参与了循环系统中的血管的病理生理过程、调节血管大小和直径、对外界物质的刺激等多个生物过程,涉及神经活性配体-受体相互作用、液体剪应力与AS、钙离子、脂质代谢等多个信号通路^[11]。以上结果虽然有一定的指导意义,但是未进行实验验证,同时又缺少组学技术初筛及权威的分析结果。基于此,本研究以“双心疾病”为研究对象通过慢性不可预知应激(CUMS)联合高脂饲养载脂蛋白E敲除(AopE^{-/-})小鼠建立、评价“双心疾病”模型,通过肝脏串联质谱标签(TMT)标记定量蛋白质组学技术进一步研究越鞠丸防治“双心疾病”的潜在作用机制,以扩大越鞠丸的主治范围,并对同类研究起到指导作用。

1 材料

1.1 动物 6周龄健康雄性SPF级AopE^{-/-}小鼠30只、同源C57BL/6J小鼠10只[购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0008],实验动物饲养于辽宁中医药大学动物实验中心的SPF级实验室,实验单位使用许可证编号SYXL(辽)2013-0009。实验室屏障通风循环良好,室温控制在20~25℃,湿度保持在45%~55%,每天光照时间为12h。本实验已经通过辽宁中医药大学动物实验伦理审查,伦理编号为21000042021007,实验期间遵守实验规定。

1.2 药物 越鞠丸颗粒(成分为苍术、香附、川芎、神曲、栀子各10g)为辽宁中医药大学草药局自制草药颗粒购自于辽宁中医药大学附属医院药房。越鞠丸剂量按照正常患者服用剂量根据《药理实验方

法学》中小鼠与人等效剂量换算公式换算,为患者服用剂量的9.1倍,小鼠给药剂量按照低剂量、高剂量继续换算分别为7.58、30.32 g·kg⁻¹·d⁻¹。

1.3 试剂 Pierce™高pH反相肽分馏试剂盒、TMT 6plex kit、TMT 10plex kit、TMT pro plex kit(美国Thermo Fisher公司,批号分别为84868、84868、90066、90111),Express Plus™ 页面凝胶(美国金斯瑞生物科技股份有限公司,批号M81612C),考马斯亮蓝G-250(上海Macklin公司,C6232),胰蛋白酶(美国Promega公司,批号V5113),十二烷基硫酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)、NH₄HCO₃、Tris、Urea(美国Sigma公司,批号分别为436143、D0632、A6141、T1378、U5128),0.5%油红O(上海碧云天生物技术有限公司,批号C0157M),苏木素-伊红(HE)染色试剂、Masson染色试剂(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C0105S、C0163M)。

1.4 仪器 EthoVision XT型动物运动轨迹跟踪系统(荷兰Noldus公司),TBA-120FR型全自动生化分析仪(日本东芝公司),QE HF-X型质谱仪、Easy-nLC1200型色谱仪(美国Thermo Scientific公司),Mini-PROTEAN Tetra型电泳系统(美国Bio Rad公司)。

2 方法

2.1 动物分组与饲养 上述小鼠经1周适应性喂养后分组饲养、灌胃,同源C57BL/6J小鼠作为空白组,予小鼠维持饲料;AopE^{-/-}小鼠按体质量随机数字表平均分配为3组,分别为模型组、越鞠丸低剂量组和越鞠丸高剂量组($n=10$),予高脂饲料喂养。

2.2 “双心疾病”小鼠模型构建 运用AopE^{-/-}小鼠高脂饲料喂饲法建立AS模型,运用CUMS法建立抑郁模型。实验期间,模型小鼠每日给予随机一种刺激(昼夜交替、冷水浴、热水浴、木屑排空、鼠笼倾斜、潮湿垫料、恐惧刺激),相邻2d不能重复同一种刺激,持续饲养12周(具体文献见增强出版附加材料)。

2.3 给药及样本收集 从建立模型开始,按照已经换算的药物剂量予越鞠丸低、越鞠丸高剂量(7.58、30.32 g·kg⁻¹·d⁻¹)组每日固定时间进行灌胃,为期12周;空白组、模型组同时间予以等体积的生理盐水灌胃。灌胃结束后,予所有小鼠禁食不禁水12h,眼球取血后断颈处死小鼠。采集全血,室温静置2h,4℃,3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径182 mm,下同)后分离上清液,冻存于-80℃冰箱中备用。采血后,于冰面上剖开腹部,收集小鼠肝脏、主动脉、心肌组织,分别浸泡于4%多聚甲醛溶液、冻存于-80℃冰箱中备用。

2.4 观察指标与模型评价

2.4.1 旷场实验(OFT)观察小鼠行为学改变 在给药前及给药后第4、8、12周每组随机选取5只小鼠进行OFT实验,将小鼠放入旷场箱正中央使小鼠在旷场箱内自由活动,适应5 min,随后开始记录每只小鼠5 min内的行为表现。记录全部数据后,用EthoVision XT软件分析各组小鼠在旷场箱中的活动情况包括站立次数、中心区域累计时间、移动总距离、移动速度并生成小鼠运动轨迹、热成像图。

2.4.2 糖水偏嗜实验(SPT)观察小鼠饮食偏好改变 在给药前及给药后第4、8、12周每组随机选取5只小鼠进行SPT实验,分别计算糖水和清水的消耗量,计算糖水偏嗜率=糖水消耗量/(糖水消耗量+清水消耗量)×100%。

2.4.3 油红O、HE染色观察小鼠主动脉、心肌、肝脏组织病理变化 每组随机选取1只完整小鼠的主动脉组织、肝脏组织进行油红O、HE染色,同时用图像分析软件测定主动脉各部位的斑块面积占比;每组随机选取1只小鼠的心肌组织进行Masson染色。

2.4.4 全自动生化分析仪检测血清指标情况 运用全自动生化分析仪分别检测小鼠血清肝功[天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)]、5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、血脂[高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)]的含量,上述试剂均购买自上海科华生物工程股份有限公司,通用包装试剂。

2.5 小鼠肝脏蛋白质组学分析

2.5.1 样品制备 肝脏样品经预实验后每组随机选取3例进行实验。将所有样品运用TMT 10标试剂进行标记定量,液氮研磨后加入SDT裂解液600 μL,4 °C,16 000 r·min⁻¹高速冷冻离心机离心20 min,BCA法进行蛋白定量测定。

2.5.2 蛋白酶解 UA缓冲液(8 mol·L⁻¹ Urea, 150 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0)200 μL转入10 kDa超滤离心管,4 °C,16 000 r·min⁻¹高速冷冻离心机离心20 min,去除滤液。经UA缓冲液进行避光20 min、清洗过滤器3次后用NH₄HCO₃溶液清洗2次。最后在37 °C用胰蛋白酶消化蛋白悬浮液16~18 h,收集含有肽段的滤液。加入适量0.1% TFA溶液复溶,使用Thermo desalting spin column脱盐处理,进行肽段定量。

2.5.3 TMT肽段标记与肽段分级 根据TMT标记试剂盒生产商所提供的说明书,每例样品取肽段

100 μg。将样品溶解在0.05 mol·L⁻¹三乙胺-碳酸缓冲液(TEAB)溶液(pH 8.5)100 μL中后,将TMT试剂溶解在无水乙腈41 μL中室温培养1 h,向样品中加入5%羟胺,培养15 min以停止反应。将多重标记的样品冷冻、干燥,干燥后的使用高-pH反相色谱柱进行分级分离。

2.5.4 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析 LC-MS/MS分析在EASY-nLC 1200纳升级液相色谱仪与Q-Exactive HF-X质谱仪上进行,将每例样品取适量肽段经过色谱分析柱进行梯度分离,流速为300 nL·min⁻¹,持续90 min。流动相,缓冲液A液为0.1%甲酸水溶液,B液为0.1%甲酸、乙腈和水混合溶液(其中乙腈为95%)。色谱柱以100%的A液平衡,梯度分离,连续线性增加B液。液相分离梯度条件:0~2 min,2%~8%(B);2~71 min,8%~28%(B);71~79 min,28%~40%(B);79~81 min,40%~100%(B);81~90 min,100%(B)。肽段分离后用Q-Exactive HF-X质谱仪进行DDA(数据依赖采集)质谱分析。

2.6 分析方法

2.6.1 统计学方法 数据统计采用SPSS 22.0进行统计分析,实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。数据经方差齐性检验和正态性检验,当方差齐时多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验;方差不齐时采用Welch法,两两比较采用Tamhane's T₂检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2.6.2 生物信息学分析 利用Perseus、Microsoft Excel和R语言对上述数据进行生信分析,筛选显著差异表达的蛋白[通常满足 $P<0.05$,同时差异表达倍数(FC) >1.2 或 <0.85]。将差异蛋白进行GO、KEGG富集分析,并进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建。

3 结果

3.1 越鞠丸对“双心疾病”模型小鼠行为学的影响

OFT结果提示第4周开始,与空白组比较,模型小鼠站立次数显著减少,差异具有统计学意义($P<0.01$),说明模型小鼠出现行为学改变。第12周模型组小鼠站立次数、中心区域累计时间、总移动距离、移动速度均显著下降,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,越鞠丸低、高剂量组小鼠上述指标均有缓解,差异具有统计学意义($P<0.01$);且与越鞠丸低剂量组比较,越鞠丸高剂量组效果更优异($P<0.01$)。见表1、表2、图1和图2。

SPT结果发现第4周开始模型组糖水偏嗜率较

空白组显著下降,越鞠丸低剂量、高剂量相对模型组糖水偏嗜率升高,差异具有显著意义($P<0.01$);第12周模型组较空白组糖水偏嗜率显著下降,与模型

组相比,越鞠丸低剂量、高剂量组均显著升高,差异具有显著意义($P<0.01$);越鞠丸高剂量较越鞠丸低剂量糖水偏嗜率升高($P<0.05$)。见表2。

表1 越鞠丸对各组小鼠OFT的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Effect of Yuejuwan on OFT of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	时间	站立次数/次	中心区域累计时间/s	总移动距离/cm	移动速度/cm·s ⁻¹
空白组		给药前	43.80±0.84	245.11±18.63	2 697.04±412.91	9.04±1.09
		第4周	30.40±5.55	258.67±6.54	2 760.39±146.40	9.44±0.49
		第8周	26.60±2.70	226.72±17.97	2 290.81±458.41	7.78±1.56
		第12周	19.80±2.59	193.87±14.33	1 768.61±122.02	6.14±0.56
模型组		实验前	43.20±2.39	248.43±9.60	2 667.31±418.20	9.37±1.12
		第4周	22.80±6.80 ²⁾	240.43±30.12	2 591.56±202.47	8.80±0.62
		第8周	21.40±2.41 ²⁾	167.47±42.14 ²⁾	1 610.71±379.61 ²⁾	5.76±1.07 ¹⁾
		第12周	2.80±1.10 ²⁾	79.36±36.04 ²⁾	746.15±437.37 ²⁾	2.98±1.40 ²⁾
越鞠丸低剂量组	7.58	实验前	42.40±2.70	244.24±15.09	2 567.59±463.53	8.54±1.24
		第4周	28.80±4.97	233.51±28.61	2 672.66±232.15	9.21±1.04
		第8周	22.40±1.52 ²⁾	219.80±31.52 ⁴⁾	1 885.88±414.86	6.60±1.24
		第12周	9.20±2.59 ^{4,6)}	146.19±32.88 ^{4,6)}	1 310.81±314.50 ^{4,6)}	4.63±1.07 ^{4,6)}
越鞠丸高剂量组	30.32	实验前	43.40±2.07	250.17±8.39	2 511.31±100.16	8.80±0.32
		第4周	29.40±3.58	240.96±20.56	2 504.99±374.86	8.47±1.30
		第8周	24.00±2.12	225.12±37.48 ⁴⁾	2 046.73±560.35	7.22±1.88
		第12周	15.8±4.76 ⁴⁾	187.63±17.62 ⁴⁾	1 820.06±19.92 ⁴⁾	6.26±0.84 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与越鞠丸高剂量组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ (表2-表7同)

表2 越鞠丸对各组小鼠SPT的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Yuejuwan on SPT of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

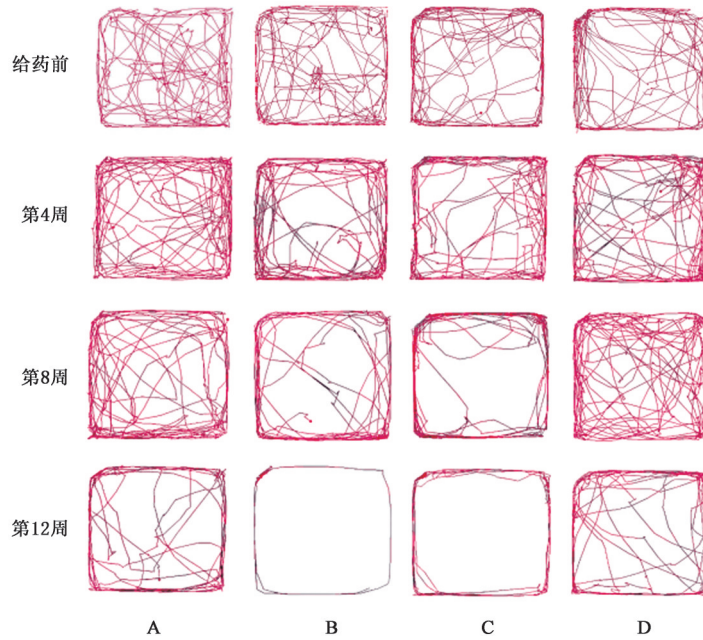
组别	剂量/g·kg ⁻¹	给药前	给药4周	给药8周	给药12周
空白组		84.81±4.36	76.52±9.88	75.00±10.66	72.57±10.64
模型组		81.67±2.83	48.91±7.31 ²⁾	51.07±9.08 ²⁾	48.22±8.52 ²⁾
越鞠丸低剂量组	7.58	85.44±3.17	68.17±5.87 ⁴⁾	66.61±6.09 ⁴⁾	65.70±2.69 ⁴⁾
越鞠丸高剂量组	30.32	84.79±4.99	72.51±5.32 ⁴⁾	74.56±3.46 ⁴⁾	76.06±5.07 ⁴⁾⁵⁾

3.2 越鞠丸对“双心疾病”小鼠主动脉、心肌、肝脏病理形态的影响 主动脉油红O结果提示第12周,空白组未见明显脂质斑块沉积($S=0.43$),模型组斑块沉积最多($S=36.32$),与模型组比较,越鞠丸低剂量组($S=18.77$)、越鞠丸高剂量组($S=18.57$)脂质斑块均减少。主动脉HE染色结果提示空白组组织染色均匀,血管平滑肌细胞形态结构正常、排列规则,未见胆固醇裂隙及纤维斑块形成,无明显炎症,模型组组织中可见显著的纤维斑块形成,结缔组织增生伴有明显胆固醇裂隙及较多泡沫细胞浸润,越鞠丸高剂量与模型组相比上述病理变化略有所缓解。心肌Masson染色结果提示与空白组相比,模型组大鼠心肌间质可见大量蓝色纤维化组织,心肌细胞

排列紊乱,心肌组织纤维化严重;越鞠丸高剂量与模型组相比上述病理变化略有所缓解。肝脏切片油红O染色、HE染色结果提示第12周,与空白组比较,模型组肝细胞内存在大量脂滴,与模型组比较,越鞠丸高剂量上述变化有所缓解。见图3。

3.3 越鞠丸对“双心疾病”小鼠血清指标的影响

12周小鼠血清检测结果提示,与空白组比较,模型组AST、ALT水平显著增多,差异具有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,越鞠丸高剂量组AST、ALT较模型组水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),说明越鞠丸高剂量具有保护肝功的作用。与空白组比较,模型组5-HT、NE水平均显著下降($P<0.01$);与模型组比较,越鞠丸高剂量组5-HT、NE



注:A.正常组;B.模型组;C.越鞠丸低剂量组;D.越鞠丸高剂量组(图2和图3同)

图1 越鞠丸对各组小鼠旷场运动轨迹的影响

Fig. 1 Effect of Yuejuwan on trajectories in OFT of mice in each group

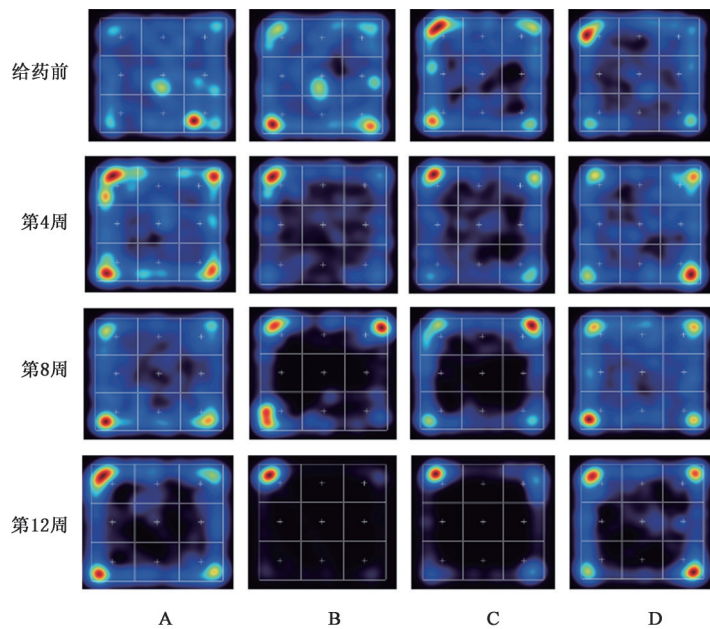


图2 越鞠丸对各组小鼠热成像的影响

Fig. 2 Effect of Yuejuwan on thermography of mice in each group

水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),说明越鞠丸高剂量具有减轻抑郁相关因子的作用。与空白组比较,模型组 HDL-C 水平显著减少($P<0.01$);与模型组比较,越鞠丸高剂量组小鼠 HDL-C 水平显著升高($P<0.01$)。与空白组比较,比模型组小鼠 TG 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,越鞠丸高剂量组小鼠 TG 水平显著减少,差异有统计学意义($P<0.01$)。说明越鞠丸高剂量具有提高血

清 HDL-C、降低血清 TC 水平起到调脂的作用。见表3和表4。

3.4 越鞠丸对“双心疾病”小鼠肝脏蛋白质组学(TMT法)的影响 根据模型评价及病理生化指标,选取正常组、模型组和疗效显著的越鞠丸高剂量组每组各3只小鼠肝脏进行TMT标记定量蛋白质组学分析。使用TMT 10标试剂对每组小鼠肝脏组织进行标记定量,使用BCA法进行蛋白定量,然后进

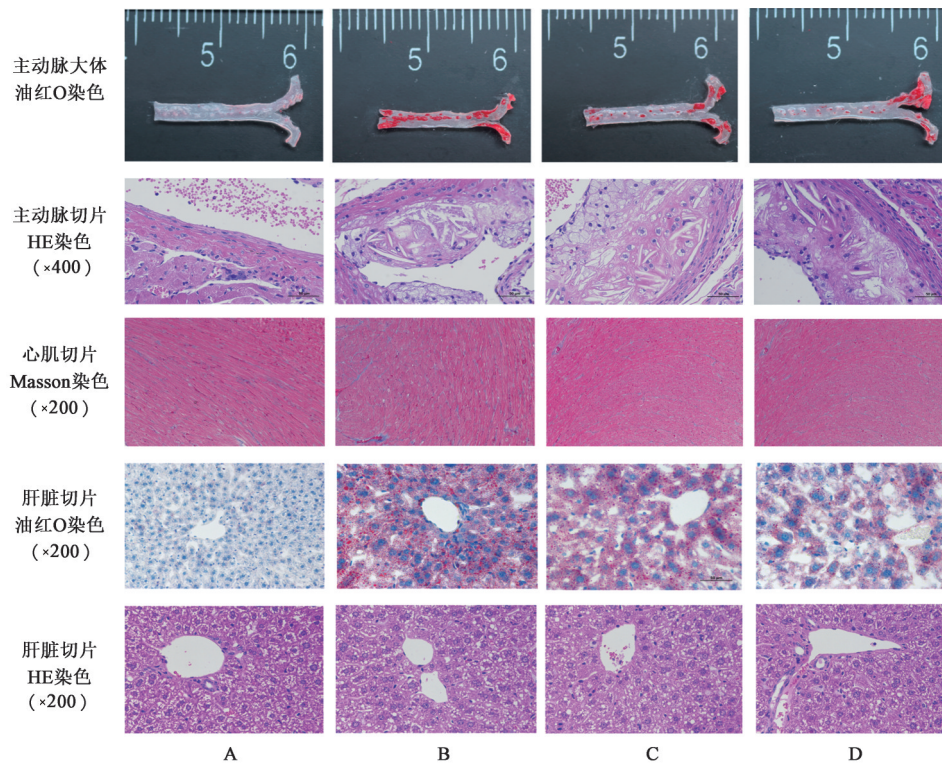


图3 越鞠丸对各组小鼠主动脉、心肌、肝脏组织病理学的影响

Fig. 3 Effect of Yuejuwan on aorta, myocardium and liver histopathology of mice in each group

表3 越鞠丸对各组小鼠血清AST、ALT、5-HT、NE水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Yuejuwan on serum AST, ALT, 5-HT, NE levels of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AST/ng·L ⁻¹	ALT/ng·L ⁻¹	5-HT/mmol·L ⁻¹	NE/mmol·L ⁻¹
空白组		105.33±10.52	26.83±5.49	239.46±36.39	31.07±3.67
模型组		199.00±15.17 ²⁾	92.33±16.80 ²⁾	159.8±11.16 ²⁾	25.03±1.38 ²⁾
越鞠丸低剂量组	7.58	175.50±29.22	95.83±21.35 ⁵⁾	202.82±30.45 ^{4,6)}	28.71±1.81
越鞠丸高剂量组	30.32	152.17±30.11 ⁴⁾	72.00±15.61 ³⁾	245.05±15.24 ⁴⁾	30.46±5.37 ³⁾

表4 越鞠丸对各组小鼠血清HDL、LDL、TC、TG水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Yuejuwan on serum HDL, LDL, TC, TG levels of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HDL-C	LDL-C	TC	TG
空白组		2.70±0.11	4.96±1.01	7.78±1.58	0.21±0.08
模型组		1.62±0.47 ²⁾	7.22±0.92 ²⁾	21.08±4.08 ²⁾	0.45±0.16 ²⁾
越鞠丸低剂量组	7.58	1.90±0.41	6.75±0.73	23.28±4.94	0.35±0.22
越鞠丸高剂量组	30.32	2.27±0.31 ⁴⁾	6.58±0.41	23.70±2.65	0.22±0.08 ⁴⁾

行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳,每组样品组间差异明显,样本整体情况较为稳定,符合质谱上机标准。

3.4.1 差异蛋白的筛选与表达分析 经TMT肽段标记与分级、LC-MS/MS分析,共发现唯一性肽段45 533个,蛋白数目5 453个,定量蛋白5 450个。用*t*检验结合差异倍数的方法,在模型组与空白组中共发现404个显著差异的蛋白,其中208个蛋白上调,196个蛋白下调;模型组与越鞠丸组共发现120个

显著差异的蛋白,其中72个蛋白上调,48个蛋白下调。

3.4.2 差异蛋白GO注释结果 将分析所得的空白组与模型组、模型组与越鞠丸组的差异蛋白分别进行GO注释,生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)分别用不同的颜色表示,具体条目的内容见增强出版附加材料。

GO注释结果分析表明,模型组与正常组相比BP类前5个过程为细胞活动进程(cellular process,

336)、代谢过程(metabolic process, 265)、生物黏附(biological adhesion, 227)、生物过程的调控(regulation of biological process, 209)、对刺激的反应(response to stimulus, 190);越鞠丸组与模型组相比BP类前5个过程为细胞活动进程(cellular process, 100)、生物调节(biological regulation, 77)、生物过程的调控(regulation of biological process, 72)、代谢进程(metabolic process, 67)、多细胞生物的过程(multicellular organismal process, 61)。富集分析后结果表明,模型组与正常组变化的BP有乙酰辅酶A代谢、对细菌的反应、细胞氨基酸分解代谢过程、体液免疫反应、有机酸代谢等过程;越鞠丸组与模型组相比变化的BP主要涉及肌肉系统进程,包括肌肉收缩、横纹肌细胞发育、肌肉系统过程调节、肌细胞发育等。

3.4.3 差异蛋白KEGG通路分析结果 KEGG通路分析结果,横坐标为 P 的 $-\lg P10$ 转换值,纵坐标为通路的名称,图中还展示了每一个通路中上调/下调蛋白的比例。将上述富集显著性靠前的通路按照level 1分类和level 2进行分类。模型组与空白组、模型组与越鞠丸组KEGG通路分析图、差异蛋白KEGG显著通路level 1、level2归类图详见增强出版附加材料。

模型组与正常组比较,差异蛋白富集后的KEGG通路与三羧酸(TCA)循环、丙酮酸代谢、糖酵解/糖异生、氨基酸代谢(精氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、组氨酸、丙氨酸,天冬氨酸、谷氨酸和色氨酸等)等通路相关;越鞠丸组与模型组比较,差异蛋白富集后与紧密连接、肥厚型心肌病、黏附斑、视黄醇代谢、心肌收缩、抗原加工提呈等通路相关。

3.4.4 亚细胞定位分析 通过分析GO数据库的CC,对差异蛋白的亚细胞定位进行注释和统计,柱形图、气泡图、饼图和环图详见增强出版附加材料。

结果提示模型组与正常组比较,差异蛋白主要定位亚细胞器为细胞质(320, 36.08%)、细胞膜(194, 21.87%)、线粒体(114, 12.85%)、胞外区(85, 9.58%)、内质网(70, 7.89%);越鞠丸组与正常组相比,差异蛋白主要定位亚细胞器为细胞质(89, 37.8%)、细胞膜(49, 20.85%)、胞外区(25, 10.64%)、内质网(20, 8.51%)、线粒体(17, 7.23%)。

4 讨论

《薛氏医案》云:“凡心脏得病,必先调其肝”,祖国医学认为心肝两脏在五行属性、经络联系、生理病理方面都有密不可分的关系。《黄帝内经·灵枢·

邪客》曰:“心者,五脏六腑之大主也,精神之所舍也”。“双心疾病”病位在心,与肝密切相关。心主神志,主宰精神、意识、思维活动,肝主疏泄,维护精神情志的调畅,心肝互为所用,共同维持正常的精神情志活动,此为心理健康;心主行血,为一身血液运行的枢纽,肝主疏泄、藏血,具有贮藏血液、调节血量、维持气血运行的功能,二者相互配合,共同维持脉道通利、血液正常运行,此为心脉健康。情志异常与肝失疏泄二者互为因果(因病致郁、因郁致病),肝失疏泄,气机郁滞,气机不畅、心血生化乏源,最终导致心神失养,血脉不利^[12-15],所以从肝入手,以调畅气机为原则是防治“双心疾病”的最佳切入点。越鞠丸,首载于《丹溪心法》,由苍术、香附、川芎、神曲、栀子5味药物组成,香附为君,以五药治六郁,重在调理气机,具有疏肝解郁,六郁同治的功效^[16-18],能以“从肝论治”角度对“双心疾病”进行治疗,因此本研究选取肝脏组织为研究对象。

当前临床数据挖掘或者依据文献选取实验指标难以精准说明中药通过多成分、多靶点、多生物过程、多通路的作用机制,因此通过组学技术发现疾病发病及治疗过程中生物标志物的具体变化已经成为中医药研究的新趋势^[19-21]。本研究通过TMT标记定量蛋白质组学技术筛选与“双心疾病”发病及越鞠丸防治过程的差异蛋白,并进行分析。

本研究选用CUMS法^[22]联合高脂饲料喂养的AopE^{-/-}小鼠建立复合模型,结果发现经过12周造模,模型组小鼠出现明显的抑郁、焦虑、兴趣丧失、绝望等表现,主动脉、肝脏病理观察也出现明显脂质沉积,心肌组织出现明显心肌纤维化增多的表现。血清5-HT、NE、HDL-C水平均显著下降,AST、ALT、TG水平明显增多,因此说明该动物模型与临床“双心疾病——心理心脏病”的临床表现初步吻合,是研究“双心疾病”的理想模型。越鞠丸高剂量组对上述病理变化均有很好的缓解作用,具有缓解抑郁焦虑状态、减轻动脉斑块、保护心肌、保护肝功能、提高血清HDL-C水平的作用,与当前越鞠丸相关研究结果相符^[7-10]。

TMT标记定量蛋白质组学技术结果发现并鉴定了多个差异蛋白,其中模型组与空白组差异蛋白相比ApoE(ID: 348)、UGT1A5(ID: 54579)、FASN(ID: 2194)蛋白显著下调,PSMD8(ID: 5714)、GPNMB(ID: 10457)、TTC39A(ID: 22996)蛋白显著上调,上述蛋白均在人体内有所表达,是“双心疾病”发病关键靶点,可以为后续研发以激动或抑制

关键靶点为作用机制的药物提供参考;越鞠丸组与模型组比较HMG N2(ID:3151)、CALD1(ID:800)、MUP7(ID:100041658)蛋白显著下调,LSM4(ID:25804)、SASS6(ID:163786)、MYH3(ID:4621)蛋白显著上调,上述蛋白除了MUP7蛋白外均在人体内有所表达,是研究越鞠丸防治“双心疾病”作用机制的重要研究对象。

通过分析GO注释结果发现,差异蛋白GO注释BP的主要结果均涉及细胞活动进程、生物过程的调控、代谢过程及细胞生理及代谢过程,说明“双心疾病”的发病和越鞠丸对其的治疗是通过多成分、多靶点、多生物过程、多通路实现的;亚细胞定位结果发现细胞质、细胞膜、线粒体、胞外区、内质网与“双心疾病”发病及越鞠丸对其的治疗关系密切,是从细胞器角度对相应机制进行研究的重点;KEGG通路分析结果发现“双心疾病”的发病过程可能与肝脏代谢功能异常有关,具体包括糖、脂、氨基酸代谢异常以及代谢枢纽TCA循环障碍等。丙酮酸在线粒体中可通过乙酰辅酶A和TCA循环实现体内三大营养物质间的互相转化,因此丙酮酸代谢异常也可以影响能量代谢变化。进一步比较越鞠丸组与模型组差异蛋白的KEGG通路分析结果发现越鞠丸可能通过调节紧密连接(TJ)相关通路起到保护肝细胞、维持血-胆汁屏障(BBIB)稳态的功能。

肝脏是一个代谢枢纽,肝细胞是肝实质的主要上皮细胞,约占70%,具有多种生理功能,包括氨基酸、碳水化合物和脂质代谢、分解毒素和调节胆汁分泌等。TJ蛋白已被证明可以通过维持细胞分化、细胞间通讯及信号蛋白的组装从而影响细胞增殖、迁移、凋亡和炎症^[23-25]。在健康的肝脏中,TJ蛋白主要在肝细胞、胆管细胞和内皮细胞^[26-29]上表达,而BBIB是由肝细胞形成的选择通透性屏障,通过TJ蛋白的连接黏附复合体将胆汁和窦血分离,调节血液和胆小管中胆汁酸的收集和释放,具有产生和分泌胆汁、解毒、与体循环代谢交换,允许特定蛋白质和凝血因子排泄等功能。BBIB这种通透性受许多生理因素调节,例如肾上腺素和血管紧张素会增加啮齿动物肝脏的灌注从而增加TJ通透性^[30],一些生长因子、细胞因子也会诱导和调控TJ蛋白的定位和表达,从而影响屏障完整性。肝细胞的组织和TJ完整性的维持对肝功能至关重要,TJ的功能障碍会导致机体胆汁酸稳态失衡,诱导胆汁淤积,引起肝损伤等很多后果^[31-33]。

大量研究表明,肝细胞损伤、胆汁酸代谢稳态

失衡与MDD、CVD的关系密切。肝脏中胆固醇的摄取、合成、代谢和排泄直接影响肝脏胆固醇水平,加强胆固醇逆向转运和增加其转化为胆汁酸是胆固醇代谢的主要途径^[34-35],是防治AS的有效方法。在MDD方面相关研究表明慢性肝病、非酒精性脂肪肝和肝硬化的患者表现出不同程度的抑郁和焦虑症状^[36-38],说明肝细胞损伤可能与抑郁发病相关;JIA等^[39]对CUMS抑郁大鼠模型肝脏受损情况进行研究,结果显示CUMS大鼠肝细胞凋亡相关的基因B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达显著上调,认为大鼠抑郁可以引起肝脏损伤;祖先鹏^[40]在MDD临患者、CUMS小鼠血清代谢组学研究中发现MDD代谢异常主要表现在甘油磷脂代谢、胆汁酸生物合成代谢、鞘脂代谢等途径上,与肝脏损伤、能量代谢紊乱密切相关。这与前文提出的肝主疏泄与情志异常二者互为因果的理论一致,也与研究结果相符合。

除此之外,本研究还发现越鞠丸可以调节肌肉系统功能从而产生心血管受益,结合GO注释及KEGG结果发现,越鞠丸可能对肌肉系统——心肌收缩、血管平滑肌(SMC)运动具有调节作用,此作用可能与心肌收缩通路、黏着斑(FA)通路相关。FA指的是细胞外基质与肌动蛋白细胞骨架之间的结构联系,具有调控细胞黏附、机械传感和控制细胞生长及分化的信号。FA蛋白的消耗会损害SMC的收缩性,通过FA信号传导,细胞能够通过产生肌球蛋白的张力和收缩力来响应细胞外基质的变化,增加血流动力学变化的敏感或通过调节整合素和收缩基因的表达来调节血管平滑肌收缩^[41-42],这对维持血管张力和调节血压至关重要。此结果也与本课题组前期网药、分子对接研究结果相符合,认为越鞠丸参与了循环系统中血管的病理生理过程、调节血管大小和直径、对外界物质刺激等多个生物过程,涉及液体剪应力、钙离子等多个信号通路^[11]。

综上,通过本次实验可以得出以下结论:①CUMS联合高脂饲养AopE^{-/-}小鼠可以很好地模拟“双心疾病”患者的临床症状,是研究“双心疾病”的理想模型,研究方法合理,具有较高的科学价值;②小鼠行为学观察、病理观察、血清因子测定说明越鞠丸具有缓解“双心疾病”小鼠抑郁、焦虑状态,减轻动脉斑块、保护心肌、保护肝功、提高血清HDL-C水平的作用;③肝脏蛋白质组学从发病角度分析,“双心疾病”模型小鼠的发病过程以及越鞠丸对其的防治过程与多个蛋白的差异表达有关,涉及

多个生物过程与通路。以上结论是课题组进一步研究越鞠丸防治“双心疾病”的重点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 中国中西医结合学会神经科专业委员会. 抑郁症中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(2): 141-148.
- [2] 胡大一. 心血管疾病和精神心理障碍的综合管理——“双心医学”模式的探索[J]. 中国临床医生, 2006(5): 2-3.
- [3] VACCARINO V, BADIMON L, BREMNER J D, et al. Depression and coronary heart disease: 2018 position paper of the ESC working group on coronary pathophysiology and microcirculation[J]. Eur Heart J, 2020, 41(17): 1687-1696.
- [4] EMDIN C A, ODUTAYO A, WONG C X, et al. Meta-analysis of anxiety as a risk factor for cardiovascular disease[J]. Am J Cardiol, 2016, 118(4): 511-519.
- [5] GOLDSTEIN B I, CARNETHON M R, MATTHEWS K A, et al. Major depressive disorder and bipolar disorder predispose youth to accelerated atherosclerosis and early cardiovascular disease: A scientific statement from the American Heart Association[J]. Circulation, 2015, 132(10): 965-986.
- [6] SONG X, SONG J, SHAO M, et al. Depression predicts the risk of adverse events after percutaneous coronary intervention: A Meta-analysis [J]. J Affect Disord, 2020, 266: 158-164.
- [7] 李洁. 压力合并高脂饮食对动脉粥样硬化的影响及越鞠丸的干预作用[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [8] 冯笑予, 高嵩山. 越鞠丸治疗痰浊阻遏型高脂血症患者疗效观察[J]. 黑龙江医学, 2013, 37(9): 796-798.
- [9] 孙素芹, 虞建华. 经方越鞠丸对颈动脉粥样硬化斑块形成患者血清炎性因子的影响[J]. 实用医药杂志, 2016, 33(5): 438-439, 443.
- [10] 王玥. 压力与冠心病的相关性研究及越鞠丸对压力致病的干预作用[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [11] 张瀚文, 于嘉祥, 张伟, 等. 基于生信分析、分子对接技术研究越鞠丸改善动脉硬化的机制并虚拟筛选其特定活性成分[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(6): 178-189.
- [12] 徐茂青, 玄进, 徐唱, 等. 中医从“双心”理论治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病伴焦虑、抑郁研究概况[J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(6): 849-854.
- [13] 刘东敏, 赵明君, 孙晓红. 从肝论治“双心疾病”探析[J]. 陕西中医药大学学报, 2021, 44(6): 41-45.
- [14] 段盈竹, 张欢, 张颖, 等. 基于“和合”思想、运用“肝心
- 和合”法治治疗双心疾病[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(2): 29-32.
- [15] 朱梦梦, 李逸雯, 刘艳飞, 等. 因郁致瘀与冠心病[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 176-182.
- [16] 朱震亨. 丹溪心法[M]. 周琦, 校注. 北京: 中国医药科技出版社, 2012: 185-186.
- [17] 黄妍妍, 南淑玲. 越鞠丸研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(9): 217-220.
- [18] 周苗苗, 魏盛, 吴建林, 等. 以“氯胺酮”与“越鞠丸”为代表的快速抗抑郁药的中医机理初探[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(2): 400-402.
- [19] DAI J, LIANG K, ZHAO S, et al. Chemoproteomics reveals baicalin activates hepatic CPT1 to ameliorate diet-induced obesity and hepatic steatosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(26): E5896-E5905.
- [20] KUMAR S, JAHANGIR ALAM M, PRABHAKAR P, et al. Proteomic analysis of the protective effects of aqueous bark extract of *Terminalia arjuna* (Roxb.) on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 198: 98-108.
- [21] LI J, ZHAO P, YANG L, et al. System biology analysis of long-term effect and mechanism of Bufeiyishen on COPD revealed by system pharmacology and 3-omics profiling [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25492.
- [22] YAN K, CHEN Y B, WU J R, et al. Current rapid-onset antidepressants and related animal models [J]. Curr Pharm Des, 2018, 24(22): 2564-2572.
- [23] SEVERSON E A, PARKOS C A. Mechanisms of outside-in signaling at the tight junction by junctional adhesion molecule A [J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1165: 10-18.
- [24] SINGH A B, UPPADA S B, DHAWAN P. Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogenesis [J]. Pflugers Arch, 2017, 469(1): 69-75.
- [25] FARKAS A E, CAPALDO C T, NUSRAT A. Regulation of epithelial proliferation by tight junction proteins [J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1258: 115-124.
- [26] KOJIMA T, SAWADA N. Expression and function of claudins in hepatocytes [J]. Methods Mol Biol, 2011, 762: 233-244.
- [27] GONZÁLEZ-MARISCAL L, TAPIA R, CHAMORRO D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1778(3): 729-756.
- [28] RAO R K, SAMAK G. Bile duct epithelial tight junctions and barrier function [J]. Tissue Barriers, 2013, 1(4): e25718.
- [29] SAKAGUCHI T, SUZUKI S, HIGASHI H, et al. Expression of tight junction protein claudin-5 in tumor

- vessels and sinusoidal endothelium in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *J Surg Res*, 2008, 147(1): 123-131.
- [30] LOWE P J, MIYAI K, STEINBACH J H, et al. Hormonal regulation of hepatocyte tight junctional permeability [J]. *Am J Physiol*, 1988, 255(4 Pt 1): G454-G461.
- [31] MAILLY L, BAUMERT T F. Hepatitis C virus infection and tight junction proteins: The ties that bind [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2020, 1862(7): 183296.
- [32] SI-TAYEB K, LEMAIGRE F P, DUNCAN S A. Organogenesis and development of the liver [J]. *Dev Cell*, 2010, 18(2): 175-189.
- [33] KOJIMA T, YAMAMOTO T, MURATA M, et al. Regulation of the blood-biliary barrier: Interaction between gap and tight junctions in hepatocytes [J]. *Med Electron Microsc*, 2003, 36(3): 157-164.
- [34] ESTELLER A. Physiology of bile secretion [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(37): 5641-5649.
- [35] RAO R K, SAMAK G. Bile duct epithelial tight junctions and barrier function [J]. *Tissue Barriers*, 2013, 1(4): e25718.
- [36] PRADHAN-SUNDD T, VATS R, RUSSELL J O, et al. Dysregulated bile transporters and impaired tight junctions during chronic liver injury in mice [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(4): 1218-1232.
- [37] XU J, KAUSALYA P J, VAN HUL N, et al. Protective functions of ZO-2/Tjp2 expressed in hepatocytes and cholangiocytes against liver injury and cholestasis [J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(6): 2103-2118.
- [38] ROEHLEN N, ROCA SUAREZ A A, EL SAGHIRE H, et al. Tight junction proteins and the biology of hepatobiliary disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 825
- [39] JIA H M, LI Q, ZHOU C, et al. Chronic unpredictable mild stress leads to altered hepatic metabolic profile and gene expression [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23441.
- [40] 祖先鹏. 抑郁症患者代谢组与肠道菌群结构特征分析及 Bacopside I 抗抑郁作用的机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2018.
- [41] RIBEIRO-SILVA J C, MIYAKAWA A A, KRIEGER J E. Focal adhesion signaling: Vascular smooth muscle cell contractility beyond calcium mechanisms [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2021, 135(9): 1189-1207.
- [42] MISHRA Y G, MANAVATHI B. Focal adhesion dynamics in cellular function and disease [J]. *Cell Signal*, 2021, 85: 110046.

[责任编辑 王鑫]