

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.11.014

实验研究

栀子豉汤对慢性应激诱导的抑郁模型小鼠脑组织神经炎症和突触可塑性的影响

陶伟伟¹, 白子君¹, 岳启予¹, 姚广大¹, 胡玥¹, 陈刚^{1,2}✉

1. 南京中医药大学中医学院/中西医结合学院, 江苏省南京市仙林大道 138 号, 210023; 2. 暨南大学中医学院

[摘要] **目的** 探究栀子豉汤的抗抑郁效果和可能作用机制。**方法** 取 50 只 C57BL/6J 小鼠随机分为空白对照组、模型组、氟西汀组和栀子豉汤高、低剂量组, 每组 10 只。除空白对照组外, 其余各组小鼠采用慢性轻度不可预测应激建立抑郁模型, 造模后栀子豉汤低、高剂量组每日分别给予栀子豉汤 3.25、6.50 g/kg 灌胃, 氟西汀组给予氟西汀混悬液 20 mg/kg 灌胃, 空白对照组和模型组每天给予 0.1 ml/10 g 生理盐水灌胃, 各组均灌胃 3 周。末次给药 1 h 后依次进行蔗糖偏好测试、悬尾实验、强迫游泳实验和旷场实验检测小鼠抑郁样表现, 蛋白免疫印迹法检测小鼠海马中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1)、剪切型 Gasdermin 家族蛋白 D (Cleaved GSDMD)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 18 (IL-18) 以及突触前膜蛋白神经突触素 1 (Synapsin-1)、突触后致密蛋白 95 (PSD-95) 蛋白表达水平, 采用免疫荧光法标记并定量小鼠脑组织离子钙结合衔接分子 1 (Iba-1) 水平, 采用高尔基染色法可视化海马神经元的树突与树突棘密度。**结果** 与空白对照组比较, 模型组小鼠蔗糖偏好率降低, 悬尾实验静止时间和强迫游泳实验静止时间延长, 海马区 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、Cleaved GSDMD 蛋白表达及脑组织 Iba-1 蛋白荧光强度升高, Synapsin-1、PSD-95 蛋白水平及树突棘密度均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 栀子豉汤高剂量组上述各指标均明显改善, 且栀子豉汤高剂量组在降低 IL-1 β , 升高 Synapsin-1、PSD-95 蛋白表达方面优于栀子豉汤低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 栀子豉汤对抑郁小鼠行为有改善效果, 可能是通过抑制海马 NLRP3 活化, 减少 IL-1 β 、IL-18 的释放, 改善了突触损伤, 增强神经可塑性, 从而发挥抗抑郁作用。

[关键词] 抑郁症; 栀子豉汤; 脑组织; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; 炎症小体; 小胶质细胞

抑郁症是一种常见的精神障碍性疾病, 2008 年世界卫生组织已将抑郁症列为全球疾病负担的第三大来源^[1]。抑郁症发病机制复杂, 其中炎症反应是主要的致病机制之一, 而核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体是介导神经炎症的主要参与者^[2]。NLRP3 炎症小体下游分泌释放的白细胞介素 1 β (IL-1 β) 或白细胞介素 18 (IL-18) 可通过自分泌或旁分泌机制刺激其他炎症细胞因子如白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 释放, 进一步放大炎症反应^[3-4]。此外,

NLRP3 炎症小体还介导小胶质细胞静息向激活形态学的转化过程^[5], 而活化的小胶质细胞是应激模型小鼠海马区神经炎症反应的重要参与者^[6], 提示 NLRP3 炎症小体可能是抑郁症的潜在有效治疗靶点。栀子豉汤作为张仲景《伤寒论》中治疗“心中懊恼, 虚烦不得眠”的经典方, 由栀子和淡豆豉组成, 临床应用广泛, 可治疗抑郁、失眠等症状^[7]。本研究以神经炎症和突触可塑性为切入点, 探讨栀子豉汤抗抑郁的相关机制, 为栀子豉汤在抑郁症的临床治疗应用提供进一步依据。本研究经南京中医药大学动物保护与伦理委员会批准, 伦理审查编号: 202110A041。

基金项目: 国家自然科学基金(81873096); 虞山医派中医经典传承奖励基金项目

✉ 通讯作者: hdn_2001@126.com, (020)85226166

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 50 只, 10~14 周龄, 体质量 20~25 g, 购自杭州子源实验动物科技有限公司, 实验动物合格证号: 20210512Abzz0105000449。饲养条件: 温度 23~25 °C, 光照/暗循环 12 h, 湿度为 40%~60%, 自由摄取食物和水。

1.2 药物

栀子购于北京同仁堂股份有限公司 (批号: 20200920), 淡豆豉购于安徽道源堂中药饮片有限公司 (批号: 210101)。根据已有文献报道^[7], 取栀子 90 g, 以 10 倍量的水加热回流 1 h 后, 再加入淡豆豉 40 g, 继续加热回流 1 h, 过滤药液, 65 °C 旋蒸浓缩至含生药量为 0.65 g/ml 的栀子豉汤提取液, 放于 4 °C 冰箱冷藏, 备用。氟西汀粉末 (5 g, 批号: F844356), 购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.3 主要试剂与仪器

蔗糖 (批号: C0740110223, 南京化学试剂股份有限公司); 二甲苯 (批号: 10023418, 国药集团化学试剂有限公司); 中性树脂 (批号: G8590)、Triton X-100 (批号: T8200)、5% 山羊血清 (批号: SL038), 北京索莱宝科技有限公司; 多聚甲醛 (批号: P0099)、4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, 批号: C1002)、ECL 发光液 (批号: P0018S)、裂解缓冲液 (批号: P0013b)、BCA 蛋白浓度试剂盒 (批号: P0012), 南京碧云天生物技术有限公司; 快速高尔基染色试剂盒 (批号: Pk401, 北京博雷德生物科技有限公司); NLRP3 抗体 (批号: ab263899, Abcam 公司); 凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 抗体 (批号: 67824)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 抗体 (批号: 89332)、IL-1 β 抗体 (批号: 63124)、IL-18 抗体 (批号: 57058)、剪切型 Gasdermin 家族蛋白 D (Cleaved GSDMD) 抗体 (批号: 10137)、突触后致密蛋白 95 (PSD-95) 抗体 (批号: 3409)、神经突触素 1 (Synapsin-1) 抗体 (批号: 5297)、GAPDH 抗体 (批号: 5174)、马抗小鼠二抗 IgG (批号: 7076), 均为 CST 公司产品; 离子钙结合衔接分子 1 (Iba-1) 抗体 (批号: 019-19741, 日本 Wako 公司); 山羊抗兔二抗 IgG [批号: ab150077, 艾博抗 (上海) 贸易有限公司]。

数码摄像头 (602F6Z 型, 深圳市沃仕达科技有限公司); 显微镜 (PLN100X 型)、荧光显微镜

(IX73 型), 奥林巴斯 (中国) 有限公司; 高速冷冻离心机 (Vlicro CL21R 型, 上海宝赛生物科技有限公司); 电泳仪 (1645050 型, 美国伯乐公司); 高通量组织研磨器 (SCIENTZ-48 型, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 冷冻切片机 [6250 型, 达科为 (深圳) 医疗设备有限公司]; 曝光仪 (Tanon-4600 型, 上海天能科技有限公司); ECL 成像系统 (EI600 型, 南京碧云天生物技术有限公司)。

1.4 造模及干预方法

采用随机数字表法将 50 只小鼠分为空白对照组、模型组、氟西汀组和栀子豉汤低、高剂量组, 每组 10 只。在适应 1 周后, 空白对照组小鼠正常饲养, 其他各组小鼠采用慢性轻度不可预测应激 5 周建立抑郁模型^[8], 应激方式包括: 禁水、禁食 24 h, 鼠笼倾斜 45°, 潮湿垫料 (100 g 木屑中含 200 ml 水), 昼夜颠倒, 夹尾 (距离尾尖 1 cm, 1 min), 振荡摇笼 (5 min), 噪声。7 种不同应激安排采用 Excel 2017 产生 7 个随机数, 以“随机数”序列排序每周随机生成, 每天接受一种刺激且相邻两天的刺激不重复, 以确保不可预测性。造模第 5 周结束时, 以蔗糖偏好率显著低于空白对照组代表造模成功^[8]。从造模第 6 周开始, 采取边造模边给药的方式, 空白对照组和模型组每天以 0.1 ml/10 g 生理盐水灌胃; 栀子豉汤低、高剂量组每天以栀子豉汤含生药量 3.25、6.50 g/kg 进行灌胃, 其中低剂量为临床等效剂量; 氟西汀组每天以氟西汀混悬液 20 mg/kg 的剂量灌胃。各组每日灌胃 1 次, 给药 3 周。

1.5 观察指标及方法

末次给药后对小鼠依次进行蔗糖偏好测试、悬尾实验、强迫游泳实验和旷场实验。在结束旷场实验测试后当日, 按照随机数字表每组选取 3 只小鼠脱颈处死后快速取海马于 -80 °C 冻存, 另取 3 只小鼠快速取整脑于 4% 的多聚甲醛固定, 另取 3 只小鼠整脑立即用于高尔基染色。

1.5.1 蔗糖偏好测试 在给药结束前 3 天各组实验小鼠进行糖水训练, 给予每只小鼠两瓶 2% 蔗糖溶液, 使其适应 24 h, 接着给予两瓶纯水适应 24 h。在禁食禁水 12 h 后, 每只小鼠单笼饲养 12 h, 末次给药 1 h 后, 进行蔗糖偏好测试。给予 2% 蔗糖溶液和纯水各 1 瓶, 测试 24 h。两瓶水的位置每隔 12 h 切换一次, 以避免位置偏好。蔗糖偏好计算公式为: 蔗糖偏好率 = [蔗糖消耗量 / (蔗糖消耗量 + 纯水消耗量)] $\times$ 100%。

1.5.2 悬尾实验 在蔗糖偏好测试后次日对各组

小鼠进行悬尾实验。将小鼠尾部通过胶带固定（离尾端约 2 cm）置于离地面 30 cm 处悬吊 6 min。当悬吊的小鼠被动地悬吊而没有明显的运动时，被认为是静止的。记录最后 4 min 小鼠的累计静止时间。

1.5.3 强迫游泳实验 在悬尾实验后次日对各组小鼠进行强迫游泳实验。将小鼠单独放在一个水深约 12 cm 的圆柱体玻璃容器（高 30 cm，直径 15 cm）中，调整水温为 26 ℃。实验共观察 6 min，记录后 4 min 内小鼠累计静止时间。静止状态定义为小鼠安静地漂浮在水中，除了保持头部露出水面的有限动作外，没有挣扎或攀爬墙壁行为。

1.5.4 旷场实验 在强迫游泳实验后次日进行旷场实验。敞箱规格为 50 cm × 50 cm × 40 cm（高），正上方 2 m 处设置数码摄像头，其视野可覆盖整个旷场内部，旷场光照为全人工照明，场区温度为（23±2）℃。将小鼠放置于敞箱中央，开始录像记录小鼠在敞箱空间内的运动轨迹，即 5 min 内小鼠在旷场中总的活动路程和中央区域停留时间（以秒为单位），并使用 Any-maze 软件（版本：4.9，美国 Stoelting 公司）自动分析。每次实验结束后及时取出小鼠，并用 75% 医用酒精擦拭敞箱内壁及底面。

1.5.5 蛋白免疫印迹法检测海马内蛋白水平 旷场实验结束后快速称取海马组织约 50 mg，剪切成细小的碎片（在冰上进行），加入预冷的 PBS 洗涤 3 次，在 4 ℃、12 000 r/min（离心半径 9.5 cm）条件下离心 10 min，去上清，加入 600 μl RIPA 裂解液，在高通量组织研磨器内充分匀浆 3 次，每次 30 s，即为组织总蛋白。采用 BCA 法对蛋白进行定量，SDS-PAGE 凝胶电泳并转 PVDF 膜，将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉封闭液中，室温孵育 1 h，加入一抗：IL-1β（1：500）、IL-18（1：500）、Cleaved GSDMD（1：500）、ASC（1：1000）、NLRP3（1：1000）、Caspase-1（1：1000）、PSD-95（1：1000）、Synapsin-1（1：1000），4 ℃冰箱中孵育过夜。TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，加入相应的 HRP 标记的二抗（兔抗，1：5000；鼠抗，1：5000），室温孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，使用 ECL 化学发光显色剂，在化学发光成像系统中显影成像。然后使用 Image J 1.8.0 软件进行量化，蛋白相对表达量为与 GAPDH 的比值。

1.5.6 高尔基染色观察神经元树突棘的形态 将新鲜脑组织块按照试剂盒说明书的实验步骤进行高尔基染色及冰冻切片等步骤，再将脑片用 50%、

75%、无水乙醇溶液梯度脱水，二甲苯透明处理，中性树胶封片。每张切片选取 2 或 3 个 II/III 层背景清晰且完整的锥体神经元进行分析。用 Neurolucida 软件（版本：11.0，美国 MBF 公司）进行追踪，重塑神经元分支，对树突的分支数进行统计。树突棘密度按以下方法分析：在 100 倍油镜下以单个神经元胞体发出的树突为起点，寻找第 3 级分支，计算 50 μm 长度范围内树突棘的个数，以每 10 μm 长度下树突棘个数反映其密度。

1.5.7 免疫荧光观察脑组织 Iba-1 的表达 脑组织在 4% 多聚甲醛中固定 48 h，冷冻切片，免疫荧光染色。用 0.3% Triton X 100 渗透 10 min，用 5% 山羊血清室温封闭 1 h，再用一抗（1：400）4 ℃孵育过夜。然后在室温下用荧光二抗处理切片 1.5 h。DAPI 暴露 10 s 后，用荧光抗淬灭剂封片，在荧光显微镜下观察 Iba-1 的荧光强度。

1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7 软件对数据进行统计分析，计量资料均满足正态分布且方差齐性，以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 Student's *t* 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠抑郁样行为学指标比较

表 1 示，与空白对照组比较，模型组小鼠蔗糖偏好率降低，悬尾实验静止时间和强迫游泳实验静止时间延长（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，栀子豉汤高剂量组和氟西汀组小鼠蔗糖偏好率升高，悬尾实验静止时间和强迫游泳实验静止时间缩短（ $P < 0.01$ ），而栀子豉汤低剂量组各指标差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。与氟西汀组比较，栀子豉汤低剂量组小鼠的悬尾实验静止时间延长（ $P < 0.01$ ）。各组小鼠旷场实验移动距离和中心停留时间比较，差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。

2.2 各组小鼠海马区内 NLRP3 炎症小体相关蛋白水平比较

表 2 示，与空白对照组比较，模型组小鼠海马区 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18、Cleaved GSDMD 蛋白表达升高（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ）。与模型组比较，栀子豉汤低剂量组 NLRP3、Cleaved GSDMD 蛋白表达降低，栀子豉汤高剂量组 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18、Cleaved GSDMD 蛋白表达降低，氟西汀组 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-

表 1 各组小鼠抑郁样行为学指标比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	蔗糖偏好率/%	悬尾实验静止时间/s	强迫游泳实验 静止时间/s	旷场实验移动距离/mm	旷场实验中心 停留时间/s
空白对照组	10	80.94±10.75	75.26±29.85	73.25±19.58	10330.00±1507.42	77.92±24.79
模型组	10	60.54±13.71 ^{a)}	111.11±25.73 ^{a)}	113.01±36.73 ^{a)}	9758.42±2405.24	77.25±21.41
栀子豉汤低剂量组	10	73.48±15.18	86.96±20.63 ^{c)}	86.76±30.92	10680.50±1496.57	76.75±20.64
栀子豉汤高剂量组	10	75.17±10.75 ^{b)}	79.07±13.57 ^{b)}	72.24±20.13 ^{b)}	10591.08±1515.99	73.25±22.00
氟西汀组	10	79.37±8.11 ^{b)}	55.49±18.84 ^{b)}	71.36±29.41 ^{b)}	10929.08±1891.67	76.08±26.22

注: a) 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与氟西汀组比较, $P < 0.01$ 。

表 2 各组小鼠海马区内 NLRP3 炎症小体相关蛋白水平比较

(/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NLRP3	ASC	Caspase-1	IL-1 β	IL-18	Cleaved GSDMD
空白对照组	3	0.55±0.09	0.81±0.12	0.38±0.08	0.30±0.11	0.42±0.07	0.46±0.09
模型组	3	0.83±0.17 ^{a)}	0.96±0.18	0.63±0.12 ^{b)}	0.64±0.13 ^{b)}	0.66±0.19 ^{a)}	0.76±0.13 ^{b)}
栀子豉汤低剂量组	3	0.67±0.21 ^{c)}	0.86±0.14	0.52±0.12	0.55±0.16	0.60±0.15	0.53±0.09 ^{c)}
栀子豉汤高剂量组	3	0.66±0.07 ^{c)}	0.86±0.16	0.46±0.13 ^{c)}	0.26±0.08 ^{d) e)}	0.44±0.13 ^{c)}	0.51±0.13 ^{d)}
氟西汀组	3	0.63±0.14 ^{c)}	0.87±0.20	0.30±0.11 ^{d)}	0.35±0.08 ^{d) f)}	0.34±0.09 ^{d) f)}	0.59±0.13

注: NLRP3, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; ASC, 凋亡相关斑点样蛋白; Caspase-1, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-18, 白细胞介素 18; Cleaved GSDMD, 剪切型 Gasdermin 家族蛋白 D。a) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b) 与空白对照组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$; d) 与模型组比较, $P < 0.01$; e) 与栀子豉汤低剂量组比较, $P < 0.01$; f) 与栀子豉汤低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

18 蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与栀子豉汤低剂量组比较, 栀子豉汤高剂量组 IL-1 β 蛋白表达降低, 氟西汀组 IL-1 β 、IL-18 蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组小鼠海马区内 NLRP3 炎症小体相关蛋白电泳图见图 1。

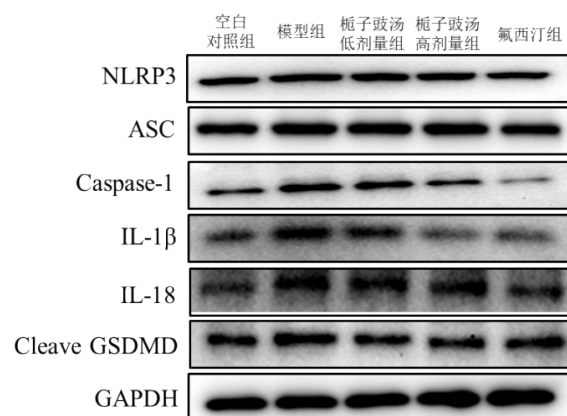
注: NLRP3, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; ASC, 凋亡相关斑点样蛋白; Caspase-1, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-18, 白细胞介素 18; Cleaved GSDMD, 剪切型 Gasdermin 家族蛋白 D。

图 1 各组小鼠海马区内 NLRP3 炎症小体相关蛋白电泳图

2.3 各组小鼠脑组织 Iba-1 蛋白表达比较

表 3 示, 与空白对照组比较, 模型组小鼠脑组织 Iba-1 蛋白荧光强度升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 氟西汀组和栀子豉汤高剂量组脑组织 Iba-1 蛋白荧光强度降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与栀子

豉汤低剂量组比较, 氟西汀组 Iba-1 蛋白荧光强度降低 ($P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠脑组织 Iba-1 蛋白荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Iba-1 蛋白荧光强度
空白对照组	3	3873.00±470.48
模型组	3	8303.67±890.01 ^{a)}
栀子豉汤低剂量组	3	7368.33±925.74
栀子豉汤高剂量组	3	5320.00±722.69 ^{b)}
氟西汀组	3	4476.33±769.74 ^{c) d)}

注: Iba-1, 离子钙结合衔接分子 1。

a) 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与栀子豉汤低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

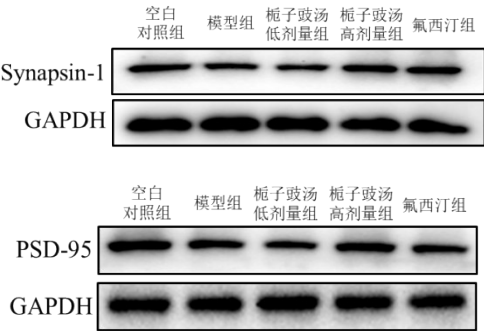
2.4 各组小鼠海马区 Synapsin-1 和 PSD-95 蛋白表达及树突棘密度比较

表 4 示, 与空白对照组比较, 模型组小鼠海马区 Synapsin-1、PSD-95 蛋白表达及高尔基染色的树突棘密度均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 栀子豉汤高剂量组和氟西汀组小鼠 Synapsin-1、PSD-95 蛋白表达及树突棘密度均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与栀子豉汤低剂量组比较, 栀子豉汤高剂量组 Synapsin-1、PSD-95 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$), 氟西汀组 Synapsin-1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。各组小鼠脑组织 Synapsin-1 和 PSD-95 蛋白电泳图见图 2, 各组小鼠脑组织神经元树突棘高尔基染色结果见图 3。

表 4 各组小鼠脑组织 Synapsin-1 和 PSD-95 蛋白表达及树突棘密度比较 (x̄±s)

组别	鼠数	Synapsin-1/GAPDH	PSD-95/GAPDH	树突棘密度 (个/10 μm)
空白对照组	3	0.59±0.05	0.81±0.10	9.25±1.09
模型组	3	0.43±0.05 ^{a)}	0.55±0.07 ^{b)}	6.25±0.8 ^{b)}
栀子豉汤低剂量组	3	0.50±0.11	0.58±0.07	6.75±0.83
栀子豉汤高剂量组	3	0.69±0.07 ^{d)} e)	0.77±0.11 ^{d)} e)	8.75±0.82 ^{d)}
氟西汀组	3	0.68±0.12 ^{d)} e)	0.67±0.09 ^{c)}	8.50±1.11 ^{e)}

注: Synapsin-1, 神经突触素 1; PSD95, 突触后致密蛋白-95。
a) 与空白对照组比较, $P<0.05$; b) 与空白对照组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与模型组比较, $P<0.01$; e) 与栀子豉汤低剂量组比较, $P<0.05$ 。



注: Synapsin-1, 神经突触素 1; PSD-95, 突触后致密蛋白 95。
图 2 各组小鼠脑组织 Synapsin-1 和 PSD-95 蛋白电泳图

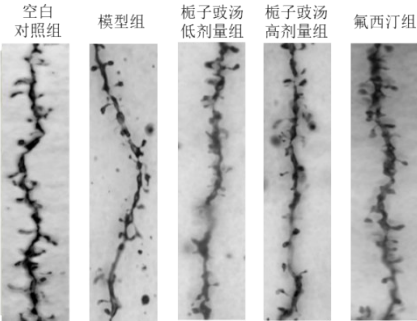


图 3 各组小鼠脑组织神经元树突棘高尔基染色结果

3 讨论

抑郁症可归属于中医学“郁证”范畴,是因情志不舒、气郁不伸导致脏腑不和而产生气滞、火郁等的一种病证。郁热可致气血阴阳亏虚,是抑郁症发病的一个始动因素。栀子豉汤由栀子和淡豆豉两味中药组成,栀子能清泄三焦郁火,淡豆豉性温可解表除烦、宣发郁热。《本草汇言》载:“栀子之为性,可升可降,气味虽居苦寒,而气本清轻”;又言栀子“清气凉血,散三焦火郁之药也”。《本草纲目》载:“黑豆性平,作豉则温,既经蒸煮,故能升能散。”两药合用,一清一宣,使气机宣畅,郁证得治。临床研究^[9]显示,栀子豉汤治疗轻度忧郁症的总有效率达 94.05%,且患者失眠等症状治疗后得到显著改善。

多种慢性轻度不可预测应激以诱导小鼠慢性抑郁样状态,其核心症状是快感缺失^[10]。模型组小鼠蔗糖偏好测试的蔗糖偏好率较空白对照组显著下降,反映出小鼠快感缺失;悬尾实验和强迫游泳实验中小鼠静止时间显著延长,这反映出小鼠的绝望。本研究中作为阳性对照药的氟西汀是临床抗抑郁一线药物。本研究结果发现,栀子豉汤高剂量组和氟西汀组给药后均能显著增加小鼠的蔗糖偏好率并显著缩短小鼠的静止时间,这表明高剂量的栀子豉汤和氟西汀有相同的抗抑郁作用。

抑郁症的发病机制复杂。近年来研究^[11]发现,神经炎症是抑郁症相关脑区最主要的病理特征,中枢神经系统发生损伤时,小胶质细胞通过分泌炎症细胞因子来检测和响应中枢神经系统稳态紊乱。炎症小体是小胶质细胞介导多种损伤模式下神经炎症反应的主要响应者,其中 NLRP3 炎症小体以其高表达及广泛分布特性成为炎症反应的研究热点。NLRP3 炎症小体主要分布于中枢神经系统的小胶质细胞和星形胶质细胞,长期神经炎症应激反应首先激活中枢小胶质细胞,同时促进其核内 NLRP3 蛋白转录过程,进而 NLRP3 蛋白与 ASC 和 Caspase-1 蛋白结合形成多蛋白炎症复合体^[12],将内源性和外源性应激信号转化为炎症反应,促进下游促炎因子(包括 IL-1β 和 IL-18)前体切割并分泌释放成熟体,放大炎症反应^[13]。临床研究^[14]证明,重度抑郁症和双向情感障碍患者的脑脊液和血清中 NLRP3 激活的细胞因子浓度显著增加,其下游分泌释放的 IL-1β 和 IL-18 可通过自分泌或旁分泌机制刺激其他炎症细胞因子如 IL-6 和 TNF-α 释放,进一步放大炎症反应。本研究结果显示,模型组小鼠海马区内 NLRP3 炎症小体相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18、Cleaved GSDMD 蛋白表达升高,而高剂量栀子豉汤可以有效降低 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18、Cleaved GSDMD 蛋白表

达, 这表明栀子豉汤改善抑郁样行为与其介导 NLRP3 炎症小体失活, 减少 IL-1 β 、IL-18 等释放相关。

此外, NLRP3 炎症小体还介导小胶质细胞静息向激活形态学的转化过程, 而活化的小胶质细胞是应激模型小鼠海马区神经炎症反应的重要参与者, 小胶质细胞标志蛋白 Iba-1 在小胶质细胞中特异性表达且在细胞活化过程中表达升高^[15]。本研究结果表明, 模型组小鼠脑组织中 Iba-1 表达升高, 这表明小胶质细胞被异常激活, 而栀子豉汤高剂量组降低了 Iba-1 表达, 提示其可抑制海马小胶质细胞的激活, 这有助于通过缓解海马神经炎症进而缓解抑郁样行为。

神经可塑性是指大脑适应各种内、外部刺激的能力, 包括神经元结构和功能变化^[16]。突触可塑性异常包括树突棘的形态异常、突触密度异常、突触丢失、信号传导异常等^[17]。海马区 PSD-95 和 Synapsin-1 蛋白水平增强是神经元突触再生和树突复杂性的重要机制^[18]。其中 PSD-95 是突触后致密物质中含量最丰富的蛋白之一, 是突触后膜的关键标志物, 其可控制突触传递并调节突触活动^[19]。而树突棘突触可塑性的降低可导致抑郁症患者海马功能缺陷并失去对情绪和情感的正常控制, 树突与树突棘形态或数量上的异常导致突触功能的紊乱是抑郁症的重要发病机制之一^[20]。本研究结果表明, 模型组小鼠海马区 PSD-95 和 Synapsin-1 蛋白水平和树突棘密度均显著降低。经栀子豉汤高剂量治疗后小鼠海马 PSD-95 和 Synapsin-1 蛋白水平以及树突棘密度恢复, 证实了栀子豉汤高剂量可改善抑郁小鼠的突触可塑性。

综上所述, 栀子豉汤具有一定抗抑郁作用, 且以高剂量与氟西汀效果相当, 其机制可能与抑制 NLRP3 炎症小体活化、抑制 IL-1 β 和 IL-18 释放、抑制小胶质细胞过度活化以减轻海马神经炎症, 以及通过提高 PSD-95 和 Synapsin-1 等突触蛋白水平和树突棘密度以增强突触可塑性有关。但中药抗抑郁具有多成分、多靶点、多机制的特点, 在今后的工作中, 将进一步阐明栀子豉汤抗抑郁的物质基础, 探索可能对应存在的上游信号通路或神经炎症及突触可塑性以外的其他作用机制。

参考文献

[1] MALHI GS, MANN JJ. Depression[J]. Lancet, 2018, 392(10161): 2299-2312.

[2] JEON SW, KIM YK. The role of neuroinflammation and neurovascular dysfunction in major depressive disorder[J]. J Inflamm Res, 2018, 11: 179-192. doi: 10.2147/JIR.S141033.

[3] LENZ KM, NELSON LH. Microglia and beyond: innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function[J]. Front Immunol, 2018, 9: 698. doi: 10.3389/fimmu.2018.00698.

[4] CONDELLO C, YUAN P, GRUTZENDLER J. Microglia-mediated neuroprotection, TREM2, and Alzheimer's disease: evidence from optical imaging[J]. Biol Psychiatry, 2018, 83(4): 377-387.

[5] THION MS, GAREL S. Microglia under the spotlight: activity and complement-dependent engulfment of synapses[J]. Trends Neurosci, 2018, 41(6): 332-334.

[6] LI Q, BARRES BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(4): 225-242.

[7] 尹树铸, 昌盛, 元海丹, 等. 栀子豉汤治疗抑郁症的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(2): 142-146.

[8] ANTONIUK S, BIJATA M, PONIMASKIN E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: meta-analysis of model reliability[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019, 99: 101-116. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.12.002.

[9] 蔡絮如. 栀子豉汤治疗轻度忧郁症之探讨与临床观察[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.

[10] WILLNER P, MUSCAT R, PAPP M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression[J]. Neurosci Biobehav Rev, 1992, 16(4): 525-534.

[11] FENG X, ZHAO Y, YANG T, et al. Glucocorticoid-driven NLRP3 inflammasome activation in hippocampal microglia mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors[J]. Front Mol Neurosci, 2019, 12: 210. doi: 10.3389/fnmol.2019.00210.

[12] HENEKA MT, MCMANUS RM, EICKE L. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2018, 19: 610-621. doi: 10.1038/s41583-018-0055-7.

[13] 王伟龙, 张跃辉, 刘琳琳, 等. NLRP3 炎症小体在神经退行性疾病中的研究进展[J]. 生命的化学, 2020, 40(6): 846-854.

[14] ZHU C, XU J, LIN Y, et al. Loss of microglia and impaired brain-neurotrophic factor signaling pathway in a comorbid model of chronic pain and depression[J]. Front Psychiatry, 2018, 9: 442. doi: 10.3389/fpsy.

2018. 00442.
- [15] LIU Y, DAI Y, LI Q, et al. Beta-amyloid activates NLRP3 inflammasome via TLR4 in mouse microglia[J]. *Neurosci Lett*, 2020, 736: 135279. doi: 10.1016/j.neulet. 2020. 135279.
- [16] FUCHS E, FLUGGE G. Adult neuroplasticity: more than 40 years of research [J]. *Neural Plast*, 2014, 2014: 541870. doi: 10.1155/2014/541870.
- [17] 郭敏, 李刚. 突触可塑性相关蛋白的研究进展[J]. *神经药理学报*, 2013, 3(6): 57-64.
- [18] XIA B, TONG Y, XIA C, et al. α -cyperone confers anti-depressant-like effects in mice via neuroplasticity enhancement by SIRT3/ROS mediated NLRP3 inflammasome deactivation [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 577062. doi: 10.3389/fphar. 2020. 577062.
- [19] SHENG M, HOOGENRAAD CC. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view[J]. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76: 823-847. doi: 10.1146/annurev.biochem. 76. 060805. 160029.
- [20] DUMAN RS. Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections[J]. *Depress Anxiety*, 2014, 31(4): 291-296.

Effect of *Zhizichi Decoction* (栀子豉汤) on Neuroinflammation and Synaptic Plasticity in Brain Tissue of Chronic Stress-induced Depression Model Mice

TAO Weiwei¹, BAI Zijun¹, YUE Qiyu¹, YAO Guangda¹, HU Yue¹, CHEN Gang^{1,2}

1. School of Traditional Chinese Medicine/ School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Jinan University

ABSTRACT Objective To explore the effect of *Zhizichi Decoction* (栀子豉汤) on depression and the possible mechanism. **Methods** Fifty C57BL/6J mice were randomly divided into blank control group, model group, fluoxetine group and *Zhizichi Decoction* high- and low-dose groups, with 10 mice in each group. Except for the blank control group, the mice were given unpredictable chronic mild stress to induce a depression model. After modeling, the low- and high-dose *Zhizichi Decoction* groups were given 3.25 and 6.50 g/kg of *Zhizichi Decoction* by gavage, respectively, while the fluoxetine group was given 20 mg/kg of fluoxetine suspension, and the blank control group was given 0.1 ml/10 g of normal saline by gavage, once daily for 3 weeks. One hour after the last medication, the sucrose preference test, the tail suspension test (TST), the forced swim test (FST) and the open field test were performed in sequence to detect the depression-like behavior in mice, and the western blotting was used to detect the expression of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein (ASC), Caspase-1, cleaved Gasdermin D (Cleaved GSDMD), interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 18 (IL-18) in the hippocampus, as well as the presynaptic membrane protein synaptophysin-1 (Synapsin-1) and postsynaptic compact protein 95 (PSD-95). Immunofluorescence was used to label and quantify the level of ionized calcium-binding adaptor 1 (Iba-1) in the brain tissue, and Golgi staining was used to visualize the density of dendrites and dendritic spines of hippocampal neurons. **Results** Compared to the blank control group, the model group had decreased sucrose preference rate, prolonged immobility time in the TST and FST, increased expression of NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , IL-18, Cleaved GSDMD in hippocampus, increased fluorescence intensity of Iba-1 in brain tissue, decreased Synapsin-1 and PSD-95 levels and dendritic spine density ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The high-dose *Zhizichi Decoction* group was better than the model group in all the above mentioned outcomes, and showed better effect than low-dose group in reducing IL-1 β and increasing the expressions of Synapsin-1 and PSD-95 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Zhizichi Decoction* can improve the behavior of depressed mice, possibly by inhibiting the activation of NLRP3 in the hippocampus, reducing the release of IL-1 β and IL-18, improving synaptic damage and enhancing neuroplasticity, thereby exerting an antidepressant effect.

Keywords depression; *Zhizichi Decoction* (栀子豉汤); brain tissue; nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3; inflammasome; microglia

(收稿日期: 2021-09-21; 修回日期: 2021-12-16)

[编辑: 邓媛]