

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.12.014

肝郁脾虚方对抑郁失眠模型大鼠结肠组织 GABA 能信号系统及肠道菌群的影响

陈抒鹏¹, 唐娜娜²✉, 王思梦¹, 王珠华¹, 徐媛媛¹, 缪慧慧¹, 黄俊山³

1. 江西中医药大学临床医学院, 江西省南昌市新建区梅岭大道 1688 号, 330004; 2. 江西中医药大学附属医院; 3. 福建省中医药科学院

[摘要] **目的** 探究肝郁脾虚方治疗抑郁共病失眠的可能作用机制。**方法** 24 只 SD 大鼠随机分为空白组, 模型组及肝郁脾虚方低、高剂量组, 每组 6 只。除空白组外, 其余各组均采用慢性不可预知温和应激方法 (CUMS) 干预 21 天构建抑郁模型, 再注射 4-氯-DL-苯丙氨酸 (PCPA) 3 天构建抑郁失眠大鼠模型。造模后肝郁脾虚方低、高剂量组分别予以肝郁脾虚方 8、32 g/(kg·d) 灌胃, 空白组及模型组以蒸馏水 20 ml/(kg·d) 灌胃, 共灌胃 14 天。采用实时荧光定量 PCR 检测大鼠结肠组织 γ -氨基丁酸 A 型受体 (GABAA)、 γ -氨基丁酸 B 型受体 (GABAB)、 γ -氨基丁酸转运蛋白 (GAT)、谷氨酸脱羧酶 (GAD) mRNA 表达, Western blot 法检测大鼠结肠组织中 GABAA、GABAB、GAT、GAD 蛋白表达。通过 16S rRNA 基因测序技术分析大鼠肠道菌群物种多样性及物种组成。Pearson 相关性分析 γ -氨基丁酸 (GABA) 能信号系统与优势菌门的相关性。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织 GABAA、GABAB 蛋白及 mRNA 表达降低, GAD 蛋白及 mRNA、GAT 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 肝郁脾虚方高、低剂量组 GABAA 蛋白及 mRNA 表达升高, GABAB mRNA 表达升高、蛋白表达下降, GAD mRNA 表达降低, GAT 蛋白表达下降 ($P < 0.05$)。与肝郁脾虚方低剂量组比较, 肝郁脾虚方高剂量组 GABAA、GAD mRNA 表达升高, GABAB 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。各组均未检测到 GAT mRNA 表达。Alpha 多样性结果显示, 与模型组比较, 肝郁脾虚方低、高剂量组 Shannoneve 指数升高, Simpson 指数降低 ($P < 0.05$)。Beta 多样性结果显示, 肝郁脾虚方低剂量组菌群结构更接近空白组。物种组成结果显示, 各组均存在的优势菌门为厚壁菌门、拟杆菌门。Pearson 相关分析显示, 厚壁菌门丰度与 GAD mRNA 表达呈负相关 ($r = -0.65$, $P = 0.02$), 与 GABAA 蛋白表达呈负相关 ($r = -0.80$, $P = 0.02$), 拟杆菌门丰度与 GAD mRNA ($r = 0.79$, $P = 0.02$)、GABAB mRNA 呈正相关 ($r = 0.69$, $P = 0.01$), 与 GABAA 蛋白表达呈正相关 ($r = 0.63$, $P = 0.02$)。**结论** 肝郁脾虚方治疗抑郁共病失眠可能是通过调节肠道微生物分布, 同时上调 GABAA 蛋白, 下调 GABAB、GAT 蛋白实现的, 且低剂量较高剂量更佳。

[关键词] 抑郁症; 失眠; 肝郁脾虚方; γ -氨基丁酸能信号系统; 肠道菌群

失眠是在合适的时机及环境下, 仍存在入睡困难或者睡眠维持障碍^[1]。失眠亦是抑郁症发作的重要危险因素之一, 两者常伴随出现^[2-3]。抑郁共病失眠 (depression-comorbid insomnia, DCI) 发病机制十分复杂, 目前主要认为与神经内分泌功能紊

乱、单胺类神经递质失衡、神经可塑性损伤等多种因素相关^[4]。研究发现肠道菌群对焦虑、抑郁、失眠等精神障碍具有重要的调节作用^[5]。 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 能修复神经元, 促进脑神经营养因子的合成, 对睡眠及情绪亦起重要的调控作用^[6]。GABA 是脑肠对话的一种重要的神经递质, 肠道内 GABA 可通过迷走神经通路、神经内分泌通路调控中枢系统^[7-8]。抑郁共病失眠常表现为入睡困难、易醒、情绪低落、少气懒言、纳食

基金项目: 国家自然科学基金 (81774285); 国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教函 [2022] 75 号); 江西省中医药中青年骨干人才培养计划 (赣中医药科教字 [2021] 4 号); 江西省中医药管理局科技计划 (2021Z013)

✉ 通讯作者: 1240181899@qq.com

减少等症状,其主要病机为肝郁脾虚^[9]。肝郁脾虚方是福建省中医药科学院睡眠研究中心治疗长期情绪低落伴失眠的经验用方,该方以健脾为主,配合疏肝,治疗失眠及调节情绪疗效确切^[9]。既往研究发现,肝郁脾虚方能增加失眠大鼠胆囊收缩素 8 (CCK8)的分泌^[10]。另有研究发现,肠道菌群可促进 CCK8 的分泌^[11],而 CCK8 可进一步促使 GABA 的释放^[12]。因此,本实验进一步从 GABA 能信号系统及肠道菌群角度探讨肝郁脾虚方治疗抑郁共病失眠的潜在机制,为其临床应用提供科学依据。该实验通过江西中医药大学伦理审查批准(审批编号:JZLLSC20220796)。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只,6~8 周龄,体质量 200~220 g,斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,实验动物使用许可证号 SCXK(京)2019-0010。饲养条件:室温(22±2)℃,相对湿度为 60%~70%,噪音<60 分贝,光照 12 h 昼夜交替。

1.2 药物及试剂

肝郁脾虚方组成:黄芪(批号:A2079453) 30 g,郁金(批号:A301A813) 15 g,甘松(批号:A1080203) 10 g,香附(批号:A3011143) 10 g,麸炒白术(批号:A2071883) 15 g,夜交藤(批号:A210C013) 15 g,珍珠母(批号:A2112323) 30 g,合欢皮(批号:A212A473) 15 g,茯神(批号:A2091193) 15 g,甘草(批号:A301L113) 6 g。配方颗粒由广东一方制药有限公司生产。

γ-氨基丁酸 A 型受体抗体(GABAA,货号 AF0760)、γ-氨基丁酸 B 型受体抗体(GABAB,货号 AF0162),美国 Affinity 公司;谷氨酸脱羧酶(GAD)抗体(货号 10408-1-AP)、γ-氨基丁酸转运蛋白(GAT)抗体(货号 28488-1-AP),美国 Proteintech 公司;4-氯-DL-苯丙氨酸(PCPA,货号 C6506-5G)、戊巴比妥钠(批号 0123A001),美国 Sigma 公司;TRIzol 试剂(总 RNA 提取,货号 CW0580S)、超纯 RNA 提取试剂盒(货号 CW0581M),北京康为世纪生物科技有限公司;RNA 逆转录试剂盒(货号 R223-01),南京诺唯赞生物科技股份有限公司;RIPA 细胞裂解液(货号 C1053),北京普利莱基因技术有限公司;二抗山羊抗鼠 IgG (H+L) HRP 偶联抗体(货号:GB23301),二抗山羊抗兔 IgG (H+L) HRP 偶联抗

体(货号:GB23303),武汉赛维尔生物科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒(货号 E-BC-K318-M),武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;E. Z. N. A™ Mag-Bind Soil DNA 提取试剂盒(货号 M5635-02),上海远慕生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

全自动样品快速研磨仪(Tiss-12 型),上海净信实业发展有限公司;紫外分光光度仪(NP80 型),德国茵普恩公司;电泳仪(DYY-8C 型)、蛋白垂直电泳仪(DYY-6C 型),北京六一生物科技有限公司;普通 PCR 扩增仪(TC-EA 型),杭州博日科技有限公司;实时荧光 PCR 仪(CFX Connect™ 型)、超高灵敏度化学发光成像系统仪(Chemi Doc™ XRS+型),伯乐生命医学产品(上海)有限公司;全自动酶标仪(SuPerMax 3100 型),上海闪普生物科技有限公司;低温高速离心机(5424R 型),Eppendorf(中国)有限公司;测序平台(Miseq PE300 型),美国 Illumina 公司;荧光计(Qubit 4 型),赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

2 方法

2.1 分组及造模

24 只 SD 大鼠分 4 笼,每笼 6 只,适应性喂养 2 天,使用 SPSS 25.0 软件生成随机数字,将 24 只大鼠随机分为空白组,模型组及肝郁脾虚方低、高剂量组,每组 6 只。除空白组外,其余各组均采用慢性不可预知温和应激方法(CUMS)制造抑郁模型^[13-14],再结合 PCPA 腹腔注射制造抑郁失眠模型^[15]。CUMS 法:通过不同的应激刺激,包括冰水游泳(4℃,5 min)、热应激(45℃,5 min)、水平振荡(30 min)、夹尾(1 min)、禁水(24 h)、禁食(24 h)和昼夜颠倒等刺激,每天抽签选择 1 种刺激法,同种刺激不能连续出现,共 21 天。通过旷场实验、Y 迷宫实验验证抑郁模型,以大鼠自主行为减弱,对外界探索失去兴趣,记忆力减退判定抑郁模型复制成功^[14]。随后模型组及肝郁脾虚方低、高剂量组予以 50 mg/ml 的浓度 PCPA(400 mg/kg)腹腔注射,每天 9:00 开始注射 1 次,连续注射 3 天,空白组注射生理盐水 8 ml/kg。注射结束第 2 天,观察各组大鼠一般情况及血清 5-羟色胺(5-HT)水平。以大鼠白天活动增加,睡眠时间减少,昼夜节律消失及血清 5-HT 水平模型组较空白组降低,差异有统计学意义判定失眠模型复制成功^[14-15]。结果显示,模型组血清 5-HT (95.26±8.23)ng/ml,较

空白组 (133.60±7.53)ng/ml 显著降低 ($P<0.05$), 且大鼠出现认知行为异常, 白天活动量增加, 攻击性增强, 睡眠时间减少, 毛发无光泽, 表明抑郁失眠模型造模成功。

2.2 给药方法

依据《中药药理实验方法学》^[16] 计算大鼠与人的等效剂量为 16 g/(kg·d), 肝郁脾虚方低剂量组、高剂量组给药剂量取等效剂量的 1/2 和 2 倍, 分别为 8、32 g/(kg·d), 药液浓度分别为 0.8 g/ml、3.2 g/ml, 模型验证成功当天开始给药, 空白组及模型组以蒸馏水 20 ml/(kg·d)灌胃。各组均每日 2 次, 干预 14 天。

2.3 观察指标及方法

末次给药后, 所有大鼠禁食不禁水 24 h, 采用 1.5% 戊巴比妥钠 150 mg/kg 腹腔注射进行安乐死, 每组按随机数字表选取 3 只大鼠作为检测大鼠。在盲肠远端 2 cm 处剪取结肠组织 6 cm, 置于冻存管内放置于-80℃冰箱冻存, 用于后续实时荧光定量实验和蛋白免疫印迹实验。同时取结肠内容物预处理后检测肠道微生物。

2.3.1 实时荧光定量法(q-PCR)检测大鼠结肠组织 GABAA、GABAB、GAT、GAD mRNA 表达 各组取检测大鼠新鲜结肠组织约 100 mg, Trizol 法提取总 RNA。采用 RNA 超纯提取试剂盒提取 mRNA, 通过紫外可见分光光度计测定 mRNA 的浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性; 通过 RNA 逆转录试剂盒合成 cDNA, 将制备好的 cDNA

进行 PCR 扩增。反应步骤如下: 预变性 95℃, 10 min; 变性 95℃, 10 s; 退火 58℃, 30 s; 延伸 72℃, 30 s; 循环 40 次。以 GAPDH 为内参, mRNA 的相对表达量根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。所有引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成, 引物序列见表 1。

2.3.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠结肠组织中 GABAA、GABAB、GAT、GAD 蛋白表达 每组取大鼠结肠组织 50 mg, 加入 RIPA 裂解液、研磨小钢珠, 用组织研磨仪研磨充分。在 12 000 r/min、4℃条件下离心 10 min (离心半径 6.26 cm), 取上清液, BCA 蛋白定量试剂盒对总蛋白进行定量。对蛋白样品进行变性后, 进行十二烷基苯磺酸钠凝胶(SDS-PAGE)电泳, 60 V 恒压电泳 0.5 h, 80 V 恒压电泳 1 h, 其中 GABAB 80 V 恒压电泳 1.5 h。后用 300 mA 恒流转膜 1.5 h。PVDF 膜用脱脂奶粉封闭后, 一抗(GABAA 1:1000; GABAB 1:1000; GAD 1:500; GAT 1:500; GAPDH 1:2000)4℃孵育过夜, TBST 洗涤, PVDF 膜室温孵育二抗[山羊抗鼠 IgG (H+L) HRP 偶联抗体 1:2000; 山羊抗兔 IgG (H+L) HRP 偶联抗体 1:2000] 120 min, TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min。置于超高灵敏度化学发光成像系统 (Chemi Doc™ XRS+) 显色曝光。通过 Image J 1.8.0 软件对各条带进行灰度扫描, 与内参 GAPDH 的比值为蛋白相对表达量。

2.3.3 肠道微生物检测 取各组大鼠结肠内粪便迅速保存至已消毒的自封袋并编号, 由上海(江

表1 大鼠结肠组织 GABAA、GABAB、GAT、GAD 引物信息
Table 1 Primer sequences for GABAA, GABAB, GAT and GAD in rats colon tissue

引物名称		引物序列 (5'-3')	产物长度/bp	退火温度/℃
GAPDH	上游	GACAAC TTTGGCATCGTGGA	133	58.2
	下游	ATGCAGGGATGATGTTCTGG		
GABAA	上游	GAGCAGACGGATGGGCTATT	133	59.73
	下游	AACCGTAGTGATACCCAGGGA		
GABAB	上游	AAAACGGACAAGTGGATTGGAGG	303	60.24
	下游	CTGGCAGACAAACGGGAAC		
GAD	上游	AGAAAACTACACAGGGTGGCTC	230	60.23
	下游	TATGGCCGGTGATTACGGTT		
GAT (1)	上游	GGGCATTGACAGCCAGTTCTGTA	223	62.13
	下游	AGACACACTCAAAGAAAACCGGA		
GAT (2)	上游	GTGTCCTACCTGATTGGCCTC	156	58.65
	下游	ATAGAACCGTTGACACCATAA		
GAT (3)	上游	CCATTTCCTGGTTTATGGTGTCA	288	60.23
	下游	GCTGCTTCAGAGAGCCCTTTA		

注: GABAA, γ-氨基丁酸 A 型受体; GABAB, γ-氨基丁酸 B 型受体; GAT, γ-氨基丁酸转运蛋白; GAD, 谷氨酸脱羧酶。

西) 中洪博元生物技术有限公司采用 16SrRNA 高通量测序技术进行肠道菌群的检测。具体步骤如下: 1) 粪便菌群总 DNA 提取: 利用 E. Z. N. A™ Mag-Bind Soil DNA 提取试剂盒提取各组大鼠粪便样本中的细菌总 DNA。2) 目标片段 PCR 扩增: 使用引物 (Nobar 341F: CCTACGGGNGGCWGCAG; Nobar 805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC) 对 16SV3-V4 进行扩增。3) Illumina NovaSeq 测序: PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳回收后, 用 Qubit® 4.0 荧光计进行文库浓度测定, 通过 Illumina NovaSeq 6000 平台进行测序。4) 数据预处理: 首先需要去除引物接头序列, 再根据两端序列之间的重叠关系, 将成对的序列拼接成一条序列, 然后按照分子条形码标签序列识别并区分样品得到各样本数据, 最后对各样本数据的质量进行质控过滤, 得到各样本有效数据。5) 操作分类单元 (OTU) 分析: 使用 Usearch 11.0.667 软件, 根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体; 利用 RDP classify 对每条序列进行物种分类注释; 使用 Mothur 1.43.0 软件进行 Alpha 多样性分析, 结果以 Chao 指数、Ace 指数、Shannoneve 指数、Simpson 指数表示。通过相似性分析 (ANOSIM) 分析组间物种差异, $R>0$ 表示组间差异大于组内差异, $R<0$ 表示组内差异大于组间差异, 同时以 PcoA 图展示 Beta 多样性, 使用 Vegan package 程序包进行 PCoA 主坐标 Beta 多样性分析。PcoA 图中两组距离越近, 物种组成结构越相似, 距离越远, 相似度越低。分析物种组成结果, 筛选各组优势菌门, 对各组均存在的优势菌门分别与对应大鼠结肠组织 GABAA、GABAB、GAD、GAT mRNA 相对表达量, GABAA、GABAB、GAD、GAT 蛋白表达做线性相关性分析。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件处理数据。计量资料均符合正态分布, 采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 方差齐者多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用

LSD 法; 方差不齐者采用韦尔奇方差分析, 两两比较采用 Games-Howell 法。相关性分析采用 Pearson 线性相关, 以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠结肠组织 GABAA、GABAB、GAD、GAT mRNA 相对表达量比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组 GABAA、GABAB mRNA 表达降低, GAD mRNA 表达升高 ($P<0.05$), 肝郁脾虚方低剂量组 GABAA、GABAB、GAD mRNA 表达降低 ($P<0.05$), 肝郁脾虚方高剂量组 GABAA、GAD mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), GABAB mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 肝郁脾虚方高、低剂量组 GABAA、GABAB mRNA 表达升高, GAD mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 与肝郁脾虚方低剂量组比较, 肝郁脾虚方高剂量组 GABAA、GAD mRNA 表达升高 ($P<0.05$), GABAB mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组均未检测到 GAT mRNA 的表达。

3.2 各组大鼠结肠组织 GABAA、GABAB、GAD、GAT 蛋白表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组 GABAA、GABAB 蛋白表达降低, GAD、GAT 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 肝郁脾虚方低剂量组 GABAA、GAD 蛋白表达升高, GABAB 蛋白表达下降 ($P<0.05$), GAT 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$); 肝郁脾虚方高剂量组 GABAA、GAD 蛋白表达升高, GABAB、GAT 蛋白表达下降 ($P<0.05$)。与模型组比较, 肝郁脾虚方低、高剂量组 GABAA 蛋白表达升高, GABAB、GAT 蛋白表达下降 ($P<0.05$), GAD 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与肝郁脾虚方低剂量组比较, 肝郁脾虚方高剂量组 GABAB 蛋白表达降低 ($P<0.05$), GABAA、GAD、GAT 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组蛋白表达电泳见图 1。

表 2 各组大鼠结肠组织 GABAA、GABAB、GAD、GAT mRNA 表达比较

Table 2 Comparison of GABAA, GABAB, GAD and GAT mRNA expression in the colon tissues of rats in each group ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\bar{x}\pm s$)

分组	鼠数	GABAA	GABAB	GAD	GAT
空白组	3	1.00±0.05	1.00±0.12	1.00±0.11	—
模型组	3	0.04±0.00 ^{a)}	0.38±0.03 ^{a)}	1.36±0.14 ^{a)}	—
肝郁脾虚方低剂量组	3	0.13±0.02 ^{a) b)}	0.69±0.05 ^{a) b)}	0.70±0.18 ^{a) b)}	—
肝郁脾虚方高剂量组	3	0.99±0.06 ^{b) c)}	0.69±0.14 ^{a) b)}	1.02±0.11 ^{b) c)}	—

注: GABAA, γ -氨基丁酸 A 型受体; GABAB, γ -氨基丁酸 B 型受体; GAD, 谷氨酸脱羧酶; GAT, γ -氨基丁酸转运蛋白; —, 不存在。

a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与肝郁脾虚方低剂量组比较, $P<0.05$ 。

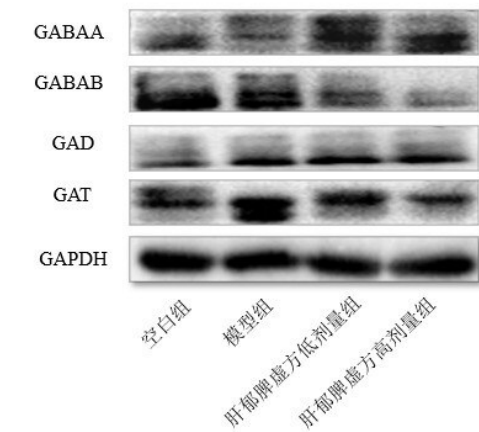
表 3 各组大鼠结肠组织 GABAA、GABAB、GAD、GAT 相关蛋白表达比较

Table 3 Comparison of GABAA, GABAB, GAD and GAT protein expression in the colon tissues of rats in each group (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

分组	鼠数	GABAA	GABAB	GAD	GAT
空白组	3	0.55±0.08	0.92±0.14	0.32±0.11	0.73±0.03
模型组	3	0.42±0.01 ^{a)}	0.67±0.13 ^{a)}	0.50±0.09 ^{a)}	0.94±0.16 ^{a)}
肝郁脾虚方低剂量组	3	0.89±0.18 ^{a) b)}	0.49±0.06 ^{a) b)}	0.52±0.02 ^{a)}	0.71±0.09 ^{b)}
肝郁脾虚方高剂量组	3	0.72±0.07 ^{a) b)}	0.35±0.09 ^{a) b) c)}	0.47±0.04 ^{a)}	0.48±0.20 ^{a) b)}

注：GABAA， γ -氨基丁酸 A 型受体；GABAB， γ -氨基丁酸 B 型受体；GAD，谷氨酸脱羧酶；GAT， γ -氨基丁酸转运蛋白。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与肝郁脾虚方低剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：GABAA， γ -氨基丁酸 A 型受体；GABAB， γ -氨基丁酸 B 型受体；GAD，谷氨酸脱羧酶；GAT， γ -氨基丁酸转运蛋白。

图 1 各组大鼠结肠组织 GABAA、GABAB、GAD、GAT 蛋白电泳图

Figure 1 Protein electrophoresis of GABAA, GABAB, GAD and GAT in colon tissues of rats in each group

3.3 各组大鼠肠道菌群物种多样性分析结果

3.3.1 Alpha 多样性分析结果 表 4 示，与空白组比较，模型组及肝郁脾虚方低、高剂量组的 Shannoneve、Chao、Ace、Simpson 指数差异均无统计学意义 ($P>0.05$)；与模型组比较，肝郁脾虚方低、高剂量组 Shannoneve 指数升高，Simpson 指数降低 ($P<0.05$)，Chao 及 Ace 指数差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与肝郁脾虚方低剂量组比较，肝郁脾虚高剂量组 Shannoneve、Chao、Ace、Simpson 指数差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

3.3.2 物种差异及 Beta 多样性分析结果 ANOSIM

表 4 各组大鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数比较

Table 4 Comparison of alpha diversity index of intestinal flora of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

分组	鼠数	覆盖率	Shannoneven 指数	Chao 指数	Ace 指数	Simpson 指数
空白组	3	0.9975	0.48±0.14	370.86±63.53	362.05±65.63	0.17±0.11
模型组	3	0.9980	0.33±0.02	374.88±47.18	368.43±41.38	0.38±0.12
肝郁脾虚方低剂量组	3	0.9979	0.56±0.06 ^{a)}	374.34±33.96	374.86±30.19	0.11±0.07 ^{a)}
肝郁脾虚方高剂量组	3	0.9982	0.53±0.08 ^{a)}	375.40±29.65	370.17±21.09	0.14±0.06 ^{a)}

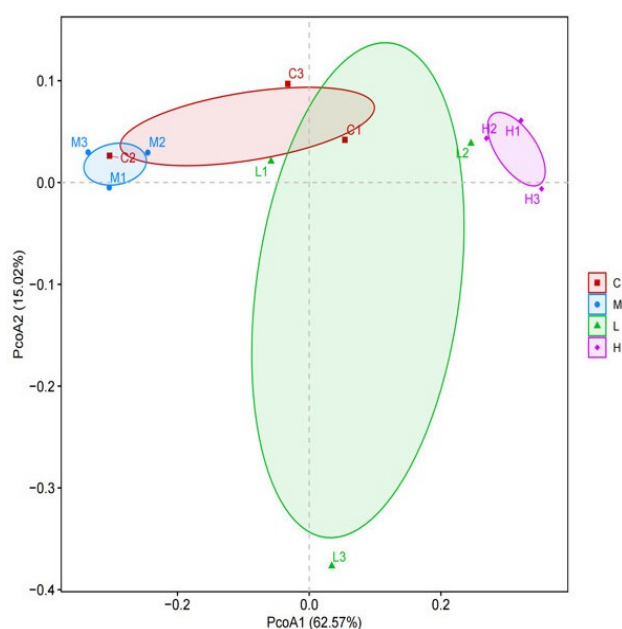
注：a) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

示， $R=0.45$ ， $P=0.008$ ，提示各组大鼠肠道微生物群落结构显著不同。图 2 示，根据主坐标分析 (PcoA) 通过将样本距离矩阵投影后，在低维度空间进行展开，第一主坐标 PcoA1 可以解释度为 62.57%，第二主坐标 PcoA2 解释度为 15.02%。模型组与空白组左端部分重合，肝郁脾虚方低剂量组与空白组右端部分重合，肝郁脾虚方高剂量组远离模型组及空白组，表明模型组及肝郁脾虚方低剂量组均与空白组的菌群结构具有一定的相似性，尤其肝郁脾虚方低剂量组更为接近空白组，肝郁脾虚方高剂量与空白组及模型组差异较大。

3.4 肠道菌群物种组成分析结果

分析各组占比前 3 的微生物。门水平，空白组：厚壁菌门 (Firmicutes, 80.75%)，拟杆菌门 (Bacteroidetes, 8.56%)，放线菌门 (Actinobacteria, 3.22%) 为优势菌门；模型组：厚壁菌门 (Firmicutes, 91.00%)，疣微菌门 (Verrucomicrobia, 3.24%)，拟杆菌门 (Bacteroidetes, 1.55%) 为优势菌门；肝郁脾虚方低剂量组：厚壁菌门 (Firmicutes, 50.16%)，疣微菌门 (Verrucomicrobia, 37.7%)，拟杆菌门 (Bacteroidetes, 8.01%) 为优势菌门；肝郁脾虚方高剂量组：厚壁菌门 (Firmicutes, 89.47%)，拟杆菌门 (Bacteroidetes, 3.79%)，变形菌门 (Proteobacteria, 2.57%) 为优势菌门。

属水平，空白组：乳杆菌属 (Lactobacillus, 50.61%)、梭状芽孢杆菌属 (Clostridium_sensu_stricto, 23.74%)、其他菌属 (Other, 12.34%) 为



注：PcoA1，第一主成分；PcoA2，第二主成分；C，空白组；M，模型组；L，肝郁脾虚方低剂量组；M，肝郁脾虚方高剂量组。

图2 各组大鼠肠道菌群Beta多样性PcoA图

Figure 2 PcoA map illustrating Beta diversity of intestinal flora of rats in each group

优势菌属；模型组：乳杆菌属 (*Lactobacillus*, 73.57%)、梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium_sensu_stricto*, 12.07%)、其他菌属 (Other, 8.13%) 为优势菌属；肝郁脾虚方低剂量组：乳杆菌属 (*Lactobacillus*, 50.78%)、毛螺菌属 (*unclassified_Lachnospiraceae*, 8.58%)、梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium_sensu_stricto*, 8.31%) 为优势菌属；肝郁

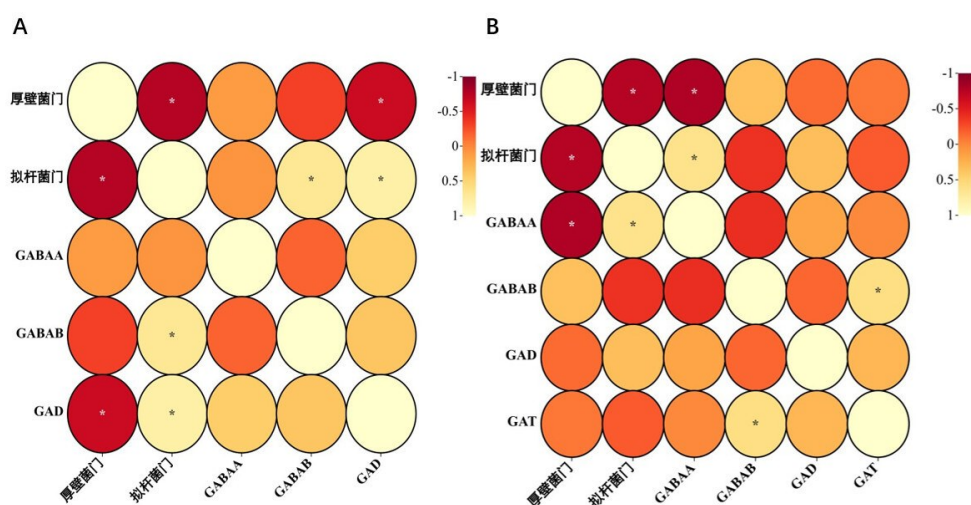
脾虚方高剂量组：苏黎世杆菌属 (*Turicibacter*, 24.10%)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*, 21.73%)、梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium_sensu_stricto*, 17.96%) 为优势菌属。

3.5 大鼠结肠组织GABA能信号系统相关mRNA及蛋白与肠道菌群的相关性分析

对各组均存在的厚壁菌门、拟杆菌门与GABA相关mRNA及蛋白进行线性相关分析。图3(A)为菌群与mRNA相关性热图，其中厚壁菌门丰度与GAD mRNA表达 ($r=-0.65$, $P=0.02$) 呈负相关，与GABAA ($r=0.10$, $P=0.74$)、GABAB ($r=-0.31$, $P=0.31$) mRNA表达无相关性。拟杆菌门丰度与GABAA mRNA表达 ($r=0.06$, $P=0.85$) 无相关性，与GABAB ($r=0.69$, $P=0.01$)、GAD ($r=0.79$, $P=0.02$) mRNA表达呈正相关。图3(B)代表菌群与蛋白相关性热图，其中厚壁菌门丰度与GABAA蛋白表达 ($r=-0.80$, $P=0.02$) 负相关，与GABAB ($r=0.34$, $P=0.27$)、GAD ($r=-0.17$, $P=0.67$)、GAT ($r=-0.08$, $P=0.81$) 蛋白表达无相关性。拟杆菌门丰度与GABAA蛋白表达 ($r=0.63$, $P=0.02$) 正相关，与GABAB ($r=-0.39$, $P=0.20$)、GAD ($r=0.32$, $P=0.29$)、GAT ($r=-0.20$, $P=0.52$) 蛋白表达无相关性。

4 讨论

长期失眠的患者常带有负面情绪，他们十分敏感且不易松弛，或者思虑过度，或者由于激烈的心理冲突导致过于兴奋、激动而不能平静。抑郁共病



注：A代表mRNA与菌门的相关性；B代表蛋白与菌门的相关性；相关系数r值以颜色展示；*代表 $P<0.05$ 。GABAA, γ -氨基丁酸A型受体；GABAB, γ -氨基丁酸B型受体；GAD, 谷氨酸脱羧酶；GAT, γ -氨基丁酸转运蛋白。

图3 大鼠优势菌门与GABA能信号系统相关性热图

Figure 3 Correlation heatmap of dominant bacterial phyla and GABAergic signaling system in rats

失眠主要表现为心境低落、睡眠障碍，归属于中医学“神机异常”范畴。心藏神，其志为喜；肝藏魂，其志为怒；脾藏意，其志为思。喜怒无常，思虑过度则神无所安，亦是当下失眠共病抑郁的主要诱因。木郁不生火则心神不明，木旺克制脾土，则脾失健运，故肝木为重要枢纽。肝郁脾虚方以郁金、香附、合欢皮疏解肝气以解久病之郁；珍珠母平肝潜阳以安神；以黄芪、白术、甘草健脾益气，培育中焦；甘松以醒脾开胃，梳理中焦气机；配合茯神、夜交藤宁心安神。该方通过调气和血，心、肝、脾同调恢复“神机”，从而发挥调畅情志、改善睡眠的功效。

抑郁共病失眠的机制十分复杂，常表现为慢波睡眠的相对减少^[17]。GABA 是一种抑制性神经递质，对中枢及外周神经起着重要的调节作用，在中枢系统中具有促进脑神经营养因子合成的作用^[6]。GABA 能信号系统亦是治疗精神障碍类疾病的重要靶点，如苯二氮草类药物可增加 GABA 与 GABAA 受体的亲和力，发挥镇静催眠、抗焦虑、抗惊厥等作用^[18]，事实上大多数苯二氮草类药物不能改善睡眠结构，反而会导致慢波睡眠的减少^[19]。GABA 能信号系统对失眠及情绪起着重要的调节作用，如激活 GABAA 发挥促睡眠、抗焦虑等作用^[20-21]，拮抗 GABAB 发挥抗焦虑、抑郁等作用^[22]。GAD 是促使谷氨酸转化为 GABA 的关键酶，GAT 是 GABA 的转运蛋白，可摄取释放的 GABA 并有效控制其在突触间隙的浓度，是控制 GABA 能信号转导的关键因素^[23]。GABAA 激动剂、GABAB 调节剂、GAT 拮抗剂已被证实能改善慢波睡眠^[24]。何婷^[25]研究发现激活 GABAA 或敲除 GABAB 基因均可产生抗抑郁效应。刘世钰等^[26]研究发现下调 GAT 可减轻抑郁症状。本实验结果显示，与空白组比较，抑郁失眠模型组大鼠 GABAA、GABAB 蛋白表达降低，GAD、GAT 蛋白显著升高，提示抑郁共病失眠可能受 GABA 能信号系统多个靶点的影响。肝郁脾虚方低、高剂量组较模型组 GABAA 蛋白升高，GABAB、GAT 蛋白降低，GAD 蛋白无显著变化，提示肝郁脾虚方可能通过上调 GABAA 蛋白以调节睡眠，下调 GABAB、GAT 蛋白改善抑郁，调节情绪。

肠道微生物的代谢对 GABA 能信号系统发挥着重要的调节作用。有研究发现人类肠道约有 58 株乳杆菌及双歧杆菌能产生 GABA^[27]，为宿主提供大量 GABA 的同时也为其他微生物的生长提供了营养物质^[28]。研究发现，肠道内 GABA、GAD 可直接

来源于肠道微生物的代谢^[27]，同时肠道微生物可通过调节 GABAA 发挥抗抑郁作用^[29]，调节 GABAB 发挥神经保护作用^[30]。尽管目前没有直接报道 GAT 来源于肠道微生物的代谢，但我们研究发现大鼠结肠组织未检测到 GAT mRNA 的表达，却发现 GAT 蛋白，PCR 实验结果显示，在 GAT (1) 引物下扩增曲线晚，且溶解曲线双峰，电泳有杂带，考虑引物出现非特异性扩增，故重新设计 2 对引物再次测试，在 GAT (2) 引物下见溶解曲线图有双峰，可能是扩增慢导致的，在 GAT (3) 引物下，有双峰且无目的条带，考虑可能是本底表达量低，查阅美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 结果显示，GAT 在大鼠脑中有表达，其他组织几乎不表达，取脑组织在以上 3 对引物中测试，扩增正常，溶解曲线单峰，电泳条带清晰。可间接表明结肠组织的 GAT 蛋白可能来源于肠道微生物的代谢。因此从肠道微生物角度认识其内在调节机制具有重要意义。Ace 指数、Chao 指数反映物种丰富度，指数越高代表物种丰富度越高。Shannoneve 反映物种个体数目在群落中分配的均匀程度，越高表示物种分配越均匀。Simpson 指数反映物种多样性，越高代表物种多样性越低。覆盖率越高，表示测序越准确，本研究中四组测序覆盖率均接近 1，表示测序准确。本研究显示，模型组较空白组的 Shannonneve、Chao、Ace、Simpson 指数均无统计学意义，即 Alpha 多样性指数无显著变化，可能由于实验观察周期较短，微生物存在自我调节能力，在机体内环境改变的条件下，短时间内有自我恢复稳态的能力。肝郁脾虚方低、高剂量组较模型组 Shannonneve 指数升高，Simpson 指数降低，即治疗后物种的均匀度及多样性升高。Beta 多样性结果显示，肝郁脾虚方低剂量组与空白组具有一定相似性，肝郁脾虚方有助于调节肠道微生物结构，而模型组与空白组也具有一定的相似性，提示了肠道微生物短时间内的自我调节能力。在物种组成上，各组门水平均以厚壁菌门、拟杆菌门为优势菌门，属水平以乳杆菌属、梭状芽孢杆菌属为优势菌属。

我们进一步分析 GABA 能信号系统相关 mRNA 与蛋白的表达与厚壁菌门及拟杆菌门的线性相关性，结果显示 GABAA 蛋白与厚壁菌门的丰度呈负相关，与拟杆菌门的丰度呈正相关。抑郁失眠模型组厚壁菌门增加、拟杆菌门占比减少与既往研究^[31]一致，同时 GABAA 蛋白也降低，经治疗后厚壁菌门占比减少、拟杆菌门占比增加，同时

GABAA 也升高。因此,肝郁脾虚方上调 GABAA 蛋白可能与调节厚壁菌门及拟杆菌门的分布有关。

综上所述,抑郁共病失眠可能受 GABA 能信号系统多靶点影响,同时在肠道微生物层面受多种菌门的调节,其中优势菌门与 GABA 能信号系统相关 mRNA 及蛋白的表达存在线性相关性。肝郁脾虚方可上调 GABAA 蛋白、下调 GABAB、GAT 蛋白,提高肠道微生物的均匀度及多样性,对多靶点调控。本研究发现结肠组织中只有 GAT 蛋白的表达未见 mRNA 的表达,可能肠道与肠道微生物代谢相关,值得进一步研究。同时本研究存在一定的不足,如抑郁失眠是一个长期的演变过程,短期动物模拟实验存在一定的偏差,在给药分组方面未设计人与大鼠的等效剂量及阳性药物对照组,不能进一步明确肝郁脾虚方的合适剂量,拟在今后研究中进行完善。

利益冲突声明

本文不存在利益冲突。

参考文献

- [1] 陆林, 马辛. 精神病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2020: 370.
- [2] SCHMITT K, HOLSBOER-TRACHSLER E, ECKERT A. BDNF in sleep, insomnia, and sleep deprivation[J]. *Ann Med*, 2016, 48(1/2): 42-51.
- [3] RIEMANN D, KRONE LB, WULFF K, et al. Sleep, insomnia, and depression[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2020, 45(1): 74-89.
- [4] 李姿蓉, 韩远山, 王宇红, 等. 从抑郁共病失眠机制探寻抑郁症新药研发的方向[J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(10): 1279-1284.
- [5] LI Y, HAO Y, FAN F, et al. The role of microbiome in insomnia, circadian disturbance and depression[J]. *Front Psychiatry*, 2018, 9: 669. doi: 10.3389/fpsy. 2018.00669.
- [6] KIM S, JO K, HONG KB, et al. GABA and l-theanine mixture decreases sleep latency and improves NREM sleep[J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 65-73.
- [7] BRAVO JA, FORSYTHE P, CHEW MV, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(38): 16050-16055.
- [8] LYTE M. Microbial endocrinology: Host-microbiota neuroendocrine interactions influencing brain and behavior[J]. *Gut Microbes*, 2014, 5(3): 381-389.
- [9] 邓晶晶, 黄俊山, 詹夏菲, 等. 黄俊山教授应用甘松治疗失眠经验[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(4): 970-971.
- [10] 张瑜, 王秀峰, 曾雪爱, 等. 肝郁脾虚方对失眠大鼠血浆和下丘脑胆囊收缩素-8 的影响[J]. *世界睡眠医学杂志*, 2021, 8(1): 38-40.
- [11] LACH G, SCHELLEKENS H, DINAN TG, et al. Anxiety, depression, and the microbiome: a role for gut peptides[J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(1): 36-59.
- [12] LANZA M, MAKOVEC F. Cholecystokinin (CCK) increases GABA release in the rat anterior nucleus accumbens via CCK(B) receptors located on glutamatergic interneurons[J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2000, 361(1): 33-38.
- [13] 徐向青, 徐向东, 宋婷, 等. 药对刺五加栀子对慢性应激抑郁模型大鼠大脑 PKC-IP₃ 信号通路的影响[J]. *中医杂志*, 2017, 58(5): 414-417.
- [14] 李杉杉, 刘新民, 王琼. 基于文献数据库的慢性不可预见性温和应激诱发抑郁症动物模型研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 77-83.
- [15] 肖成荣, 马增春, 李海静, 等. PCPA 失眠大鼠模型的制作及其机制[J]. *毒理学杂志*, 2007, 21(4): 326.
- [16] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 25.
- [17] MURPHY MJ, PETERSON MJ. Sleep disturbances in depression[J]. *Sleep Med Clin*, 2015, 10(1): 17-23.
- [18] 程金湘, 张丽萍, 宿长军. 慢性失眠障碍患者长期使用苯二氮草类药物停药的研究进展[J]. *中国全科医学*, 2022, 25(27): 3347-3351.
- [19] 宿长军, 刘煜, 李柱一, 等. 黛力新与多塞平联合治疗原发性失眠[J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26(5): 96-98.
- [20] WICHNIAK A, WIERZBICKA AE, JAREMA M. Treatment of insomnia-effect of trazodone and hypnotics on sleep[J]. *Psychiatr Pol*, 2021, 55(4): 743-755.
- [21] TRINCAVELLI ML, DA PE, DANIELE S, et al. The GABAA-BZR complex as target for the development of anxiolytic drugs[J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(4): 254-269.
- [22] MÖHLER H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential[J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(1): 42-53.
- [23] BHAGAT K, SINGH JV, PAGARE PP, et al. Rational approaches for the design of various GABA modulators and their clinical progression[J]. *Mol Divers*, 2021, 25(1): 551-601.
- [24] DIJK DJ. Slow-wave sleep deficiency and enhancement: implications for insomnia and its management[J]. *World J Biol Psychiatry*, 2010, 11(Suppl 1): 22-28.
- [25] 何婷. 慢性应激性抑郁发生与海马 Glu 和 GABA 水平变化及其受体机制[D]. 西安: 陕西师范大学, 2011.

- [26]刘世钰,何丹,赵亮,等. 养心氏片抗抑郁作用的蛋白组学研究[J]. 中南药学, 2018, 16(5): 593-601.
- [27]YUNES RA, POLUEKTOVA EU, DYACHKOVA MS, et al. GABA production and structure of gadB/gadC genes in Lactobacillus and Bifidobacterium strains from human microbiota [J]. Anaerobe, 2016, 42: 197-204. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.10.011.
- [28]STRANDWITZ P, KIM KH, TEREKHOVA D, et al. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota [J]. Nat Microbiol, 2019, 4(3): 396-403.
- [29]LIANG L, ZHOU H, ZHANG S, et al. Effects of gut microbiota disturbance induced in early life on the expression of extrasynaptic GABA-A receptor $\alpha 5$ and δ subunits in the hippocampus of adult rats [J]. Brain Res Bull, 2017, 135: 113-119. doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.09.014.
- [30]LI H, XIAO J, LI X, et al. Low cerebral exposure cannot hinder the neuroprotective effects of panax notoginsenosides [J]. Drug Metab Dispos, 2018, 46(1): 53-65.
- [31]LIN P, DING B, FENG C, et al. Prevotella and Klebsiella proportions in fecal microbial communities are potential characteristic parameters for patients with major depressive disorder [J]. J Affect Disord, 2017, 207: 300-304. doi: 10.1016/j.jad.2016.09.051.

Effect of *Ganyu Pixu Formula* (肝郁脾虚方) on Regulation of GABAergic Signaling System and Intestinal Flora in Colon Tissue of Depressed and Insomniac Model Rats

CHEN Shupeng¹, TANG Nana², WANG Simeng¹, WANG Zhuhua¹, XU Yuanyuan¹, MIAO Huihui¹, HUANG Junshan³

1. School of Clinical Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, 330004; 2. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine; 3. Fujian Academy of Chinese Medical Science

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Ganyu Pixu Formula* (肝郁脾虚方, GPF) in treatment of depression-comorbid insomnia (DCI). **Methods** Twenty four SD rats were selected and randomly divided into blank group, model group, low- and high-dose GPF groups, with six rats in each group. Except for blank group, the depression and insomnia models were made by chronic unpredictable mild stress (CUMS) intervention for 21 days combined with 4-chloro-DL-phenylalanine (PCPA) injection for three days. After successful modeling, 8 g/(kg·d) and 32 g/(kg·d) of GPF were administered by gavage in the low- and high-dose GPF groups, respectively, while 20 ml/(kg·d) of distilled water was given by gavage to the blank and model groups, all for 14 days. The mRNA expression of γ -aminobutyric acid type A receptor (GABAA), γ -aminobutyric acid type B receptor (GABAB), γ -aminobutyric acid transporter (GAT) and glutamate decarboxylase (GAD) in rat colon tissue was detected by real-time fluorescent PCR, and the protein expression of GABAA, GABAB, GAT and GAD in rat colon tissue was detected by Western blot. The species diversity and species composition of rat intestinal flora were analyzed by 16S rRNA gene sequencing technology. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between GABAergic signal system and intestinal flora. **Results** Compared to those in the blank group, the protein and mRNA expression of GABAA and GABAB in the colon tissue of rats in the model group decreased, while GAD protein and mRNA expression and GAT protein expression increased ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, expression of GABAA protein, GABAA mRNA and GABAB mRNA expression in the high- and low-dose GPF groups increased, while expression of GABAB protein, GAT protein and GAD mRNA decreased ($P < 0.05$). The high-dose GPF group had higher GABAA and GAD mRNA expression and lower GABAB protein expression than the low-dose group ($P < 0.05$). The expression of GAT mRNA was not detected in the four groups. Alpha diversity showed that the high- and low-dose GPF groups had higher Shannoneve index and lower Simpson index compared to the model group ($P < 0.05$). Beta diversity showed that the intestinal flora structure of low-dose GPF group was closer to that of the blank group. The composition of species showed that the dominant bacterial phyla in all groups were Firmicutes and Bacteroidetes. Pearson correlation analysis showed that Firmicutes abundance was negatively correlated to GAD mRNA expression ($r = -0.65$, $P = 0.02$), and GABAA protein expression ($r = -0.80$, $P = 0.02$). The abundance of Bacteroidetes was positively correlated to GAD mRNA ($r = 0.79$, $P = 0.02$), GABAB mRNA ($r = 0.69$, $P = 0.01$), and GABAA protein expression ($r = 0.63$, $P = 0.02$). **Conclusion** GPF may treat DCI through regulating intestinal flora distribution, up-regulating GABAA protein, and down-regulating GABAB and GAT proteins, and the lower dose has better effects.

Keywords depression; insomnia; *Ganyu Pixu Formula* (肝郁脾虚方); GABAergic signaling system; intestinal flora (收稿日期: 2022-10-04; 修回日期: 2023-02-16)

[编辑: 王利芬]